

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DISTRIBUCIONES DE AFINIDAD TERMODINÁMICA  
Y DE SITIO EN LA HEMOGLOBINA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

MARIA DEL MAR HERNÁNDEZ GAZQUEZ

Tutor: Dr. Marco A. José Valenzuela

Ciudad Universitaria, México, D.F.  
2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: MARIA DEL MAR  
HERNANDEZ GÁZQUEZ

FECHA: 03 MARZO 2004

FIRMA: 

## Agradecimientos

A todos los miembros del laboratorio por su gran ayuda, su apoyo y tantas pláticas metadimensionales. Muchas gracias por todo lo que aprendí con ustedes.

A Citlali y a Paco por obligarme a seguir y descubrirme en el camino que llegar al final es la recompensa.

A mi familia completita por enseñarme cada día a disfrutar de la vida.

A los superpoderosos chanchitos por todo aquello que no puedo escribir.

Esta tesis es para Rauru-San y la guía Kirisa. También para Quirri.

<b>RESUMEN</b>	2
<b>INTRODUCCION</b>	3
DISTRIBUCIONES DE AFINIDAD	11
LA HEMOGLOBINA: el paradigma alostérico	15
EL HEMO	18
LA UNION DEL O <sub>2</sub> A LA HEMOGLOBINA ES COOPERATIVA	20
AFINIDAD Y ESTRUCTURA	24
REGULACION ALOSTERICA	30
EL MODELO MWC O MODELO DE SIMETRIA	31
EL MODELO SECUENCIAL	36
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	43
<b>TEORIA</b>	44
DISTRIBUCIONES DE AFINIDAD ESTEQUIOMETRICAS EN SISTEMAS HETEROGENEOS DE RECEPTORES MULTIVALENTES	45
DISTRIBUCIONES ESTEQUIOMETRICAS DE AFINIDAD DE LA HEMOGLOBINA	47
<b>RESULTADOS</b>	52
<b>DISCUSION</b>	61
<b>APENDICE</b>	66
<b>REFERENCIAS</b>	74

## RESUMEN

En este trabajo presentamos la caracterización de las distribuciones probabilísticas de afinidad termodinámica ( $T_i(K_i)$ ) y de sitio ( $n(k)$ ), de receptores multivalentes que presentan interacciones positivas entre sus sitios activos. En particular se presenta el cálculo de dichas distribuciones para el caso de la hemoglobina en su interacción con  $O_2$  y  $CO$ . La importancia de las distribuciones termodinámicas radica en que pueden relacionarse directamente con cantidades medibles experimentalmente, y representan distribuciones de afinidad por paso de fijación. Nuestros resultados muestran que las interacciones positivas generan tanto distribuciones estequiométricas como de sitio con patrones complejos y multimodales, muy distintos de los observados en ausencia de interacciones.

Estas distribuciones parecen indicar la generación de heterogeneidad durante la saturación, como resultado de la cooperatividad positiva inducida durante el proceso de fijación de ligandos. Las distribuciones de afinidad predichas por los modelos MWC y KNF fueron también analizadas, y en ambos casos se obtuvo el mismo patrón multimodal. El análisis de las distribuciones termodinámicas construidas directamente a partir de datos experimentales de fijación del  $O_2$  a la hemoglobina, sugiere que estas distribuciones complejas pueden relacionarse con las funciones fisiológicas de captura, transporte y liberación de ligandos gaseosos por esta proteína alostérica.

## INTRODUCCIÓN

Las interacciones ligando-receptor constituyen generalmente el primer paso en el proceso de señalización intracelular para producir una gran variedad de respuestas biológicas. Estas interacciones constituyen un mecanismo universal de comunicación en los sistemas biológicos, y es por esta razón que se han dedicado esfuerzos considerables a la caracterización de las interacciones en las que, ligandos y receptores se encuentran en equilibrio termodinámico.

Es un hecho establecido, que para profundizar en el entendimiento de las interacciones multimoleculares, es necesario examinar y correlacionar las características termodinámicas con los detalles estructurales y cinéticos. A pesar de que las estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos sin duda alguna nos proveen de información crítica sobre la arquitectura molecular, estos datos no aportan información acerca de la estabilidad de la molécula, o de las propiedades o características energéticas de sus interacciones; esto último, puede determinarse únicamente a través de estudios termodinámicos.

En el nivel fundamental, la termodinámica describe cuantitativamente las transformaciones de energía de un estado a otro. Los estudios termodinámicos nos permiten la medición de cambios en parámetros tales como la energía libre, la entalpía, y la entropía, que ocurren en los procesos al equilibrio en los organismos. Los cambios medidos en los parámetros termodinámicos, pueden entonces utilizarse para entender mejor las interacciones moleculares que regulan diferentes procesos vitales en los organismos. Desde el punto de vista práctico, los estudios termodinámicos en los sistemas biológicos tiene que ver con dos aspectos fundamentales: la estabilidad de una macromolécula particular, lo cual involucra una descripción del equilibrio entre los estados naturalizado y desnaturalizado; y la unión de una molécula a otra, en donde el equilibrio se establece entre las formas libre y ligada de la molécula.

El ejemplo más simple de la interacción reversible de una proteína con un receptor, o bien de una proteína con otra, para formar un complejo puede expresarse de la siguiente forma general:



Donde  $R$  representa a la molécula receptora y  $F$  al ligando libre.

En general, en este punto se recurre a la ley de acción de masas (Guldberg & Waage, 1867; Raffa, 2001), para definir el concepto de constante de equilibrio, que está dado por la razón que involucra las concentraciones de reactantes y productos. En este caso se trata de una aproximación basada en un modelo en el cual los reactantes están presentes a bajas concentraciones, y están libres en solución, mientras que la mayoría de los receptores están circunscritos a membranas u otras estructuras. Debido a esto, no es posible predecir a priori con exactitud la velocidad a la cual ocurren la mayoría de las reacciones bioquímicas, por lo que resulta más apropiado utilizar principios termodinámicos tales como el de la conservación de la energía, que nos indica simplemente si una reacción puede o no proceder espontáneamente.

El cambio en la energía libre ( $\Delta G$ ) para la reacción en la dirección indicada, esta dada por:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left( \frac{[RF]}{[R][F]} \right), \quad [2]$$

donde  $\Delta G^\circ$  representa la energía libre estándar, los paréntesis representan las concentraciones respectivas de receptor y ligando libre, así como del complejo formado durante la reacción,  $R=1.99 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$  ( $=8.31 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin ( $K=^\circ\text{C}+273.15$ ).

El punto de partida para la caracterización termodinámica de casi cualquier interacción biológica es la determinación del  $\Delta G$ . Una reacción puede proceder espontáneamente solo cuando el  $\Delta G$  en esa dirección es negativo.

---

\* Esta notación será utilizada a lo largo de esta tesis, con la intención de ser consistentes con la nomenclatura usada en el artículo Hernández & José, 2003.

La mayoría de las interacciones ligando-receptor se estudian al equilibrio. En este caso,  $\Delta G=0$ , por lo que la ecuación [2] puede describirse como:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \left( \frac{[RF]}{[R][F]} \right). \quad [3]$$

La razón que involucra las concentraciones de reactantes y productos es equivalente a la constante de equilibrio  $K$ ,

$$K = \left( \frac{[RF]}{[R][F]} \right), \quad [4]$$

por lo que

$$\Delta G^\circ = -RT \ln(K). \quad [5]$$

Como puede observarse, el valor cualitativo y cuantitativo de la constante de asociación se deriva de las leyes universales de la termodinámica

La ecuación [1] indica que la mezcla al equilibrio contiene tanto a la molécula receptora libre ( $R$ ), al ligando libre ( $F$ ), como al complejo que se haya formado ( $RF$ ). Intuitivamente, el valor de  $K$  es una medida de la afinidad o bien de la fuerza de la interacción entre  $R$  y  $F$ , de tal manera que mientras más grande sea el valor de  $K$  más fuerte será la asociación del complejo.

El valor de  $K$  puede determinarse de diferentes maneras. A través de la ecuación [4], puede notarse que métodos que midan las concentraciones de las especies de ligando libre y unido son útiles para evaluar  $K$ . Estos métodos se basan generalmente en 3 principios: separación física de la muestra; estimaciones espectroscópicas de las concentraciones relativas y manipulación del equilibrio para provocar condiciones bajo las cuales las concentraciones de los componentes sean conocidas (ej.  $T=T_m$ , pH).

En un experimento de fijación de ligandos a receptores, usualmente el experimentador conoce las concentraciones iniciales de receptor  $[R]_{tot}$  y ligando libre  $[F]_{tot}$ . Cuando las soluciones se mezclan y alcanzan el equilibrio, se tiene:

$$[R]_{tot} = [R] + [RF] \quad \text{y} \quad [F]_{tot} = [F] + [RF] \quad [6]$$

Si  $[R]_{tot}$  se mantiene constante, y  $F$  es administrado a la mezcla que contiene la macromolécula receptora, la probabilidad de que una molécula de ligando se una al receptor aumenta de tal manera que la proporción de  $[R]_{tot}$  que se transforma en  $[RF]$  aumenta. Eventualmente, toda  $[R]_{tot}$  se encontrara como  $[RF]$  y  $[F]$  libre será cero. Esto se conoce como saturación, y se representa por el parámetro  $r$ . Este parámetro representa el número promedio de moléculas de ligando unidas a un receptor y estequiométricamente se define como:

$$r = \frac{[RF]}{[R]_{tot}} = \frac{[RF]}{[R] + [RF]} \quad [7]$$

Para un receptor con múltiples sitios activos ( $v > 1$ ), la ecuación [1], es una representación demasiado simplista. Para empezar, la fijación del ligando ocurre, en la mayoría de los casos, en pasos sucesivos, cada uno de los cuales con su propia constante de equilibrio. Además, es necesario apreciar que para un receptor multivalente ( $v > 1$ ), debe distinguirse entre dos tipos diferentes de constantes de equilibrio (Klotz, 1997; Klotz, 2001), las cuales se designan generalmente como estequiométricas y de sitio respectivamente. Comúnmente, estos dos tipos de constantes de equilibrio, son también llamadas constantes macroscópicas y microscópicas respectivamente. Sin embargo, esta designación no es estrictamente apropiada, puesto que los valores numéricos para ambas se expresan en unidades microscópicas de molaridad.

Tan pronto como cambiamos de un receptor univalente a especies moleculares que pueden fijar dos o más moles de ligando, aparecen ambigüedades con respecto a qué transformaciones moleculares hacen referencia las constantes de equilibrio. Examinando el caso más simple de estas situaciones, esto es, un receptor ( $R$ ) con 2 sitios activos idénticos e independientes, se tiene que desde la perspectiva estequiométrica (figura 1a), la unión del primer (mol) de ligando esta dada por:

$$R + F = RF_1; K_1 = \frac{(RF_1)}{(R)(F)} \quad [8]$$

Mientras que para la unión del segundo ligando:

$$RF_1 + F = RF_2; K_2 = \frac{(RF_2)}{(RF_1)(F)} \quad [9]$$

Para la formulación de las constantes de sitio, por su parte, en el caso de que cada sitio tenga una afinidad fija e invariable, es decir, independiente de la unión del ligando al otro sitio activo, designaremos las constantes de equilibrio de los sitios individuales como  $k_1$  y  $k_2$  respectivamente, y los correspondientes equilibrios para los sitios de acuerdo con el esquema de la figura 1b como sigue:

$$R + F = {}_1RF; k_1 = \frac{({}_1RF)}{(R)(F)} \quad [10]$$

$${}_1R + F = {}_{1,2}RF_2; k_2 = \frac{({}_{1,2}RF_2)}{({}_1RF)(F)} \quad [11]$$

o bien, considerando que se trata de un proceso secuencial:

$$R + F = {}_2RF; k_2 = \frac{({}_2RF)}{(R)(F)} \quad [12]$$

$${}_2RF + F = {}_{1,2}RF; k_1 = \frac{({}_{1,2}RF_2)}{({}_2RF)(F)} \quad [13]$$

Donde los subíndices a la izquierda de  $R$  identifican los sitios que están ocupados (figura 1b).

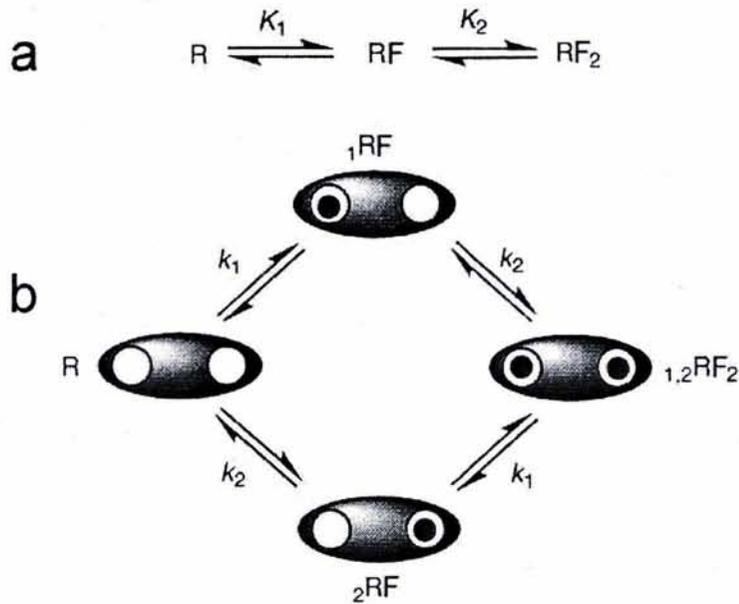


Figura 1. Constantes de afinidad estequiométricas (a) y termodinámicas (b), para un receptor dimérico con sitios independientes. R representa el receptor, F al ligando, los círculos abiertos representan sitios libres, y los oscuros los unidos al ligando.

Ahora bien, si la afinidad de los sitios cambia con el grado de ocupación de la macromolécula o receptor, entonces, la representación de las constantes de equilibrio de los sitios se vuelve más compleja, a pesar de que aquellas que describen el equilibrio estequiométrico permanecen sin cambio (figs. 1a y 2a). Cuando los sitios no son independientes, se tienen 4 diferentes constantes de equilibrio para la descripción sitio-específica (Fig. 2b):

$$k_1 = \frac{({}_1RF)}{(R)(F)}, \quad [14]$$

$$k_2 = \frac{({}_2RF)}{(R)(F)}, \quad [15]$$

$$k_{1,2} = \frac{({}_{1,2}RF_2)}{({}_1RF)(F)}, \quad [16]$$

$$k_{2,1} = \frac{({}_{1,2}RF_2)}{({}_2RF)(F)}, \quad [17]$$

El orden de los índices para  $k_{1,2}$  y  $k_{2,1}$  especifica en primer lugar, el sitio que ya se encontraba ocupado antes de la unión del segundo sitio que denota el correspondiente equilibrio. Cuando la afinidad varía con el grado de ocupación del receptor, entonces

$$k_1 \neq k_{2,1} \quad [18]$$

así mismo,

$$k_2 \neq k_{1,2}. \quad [19]$$

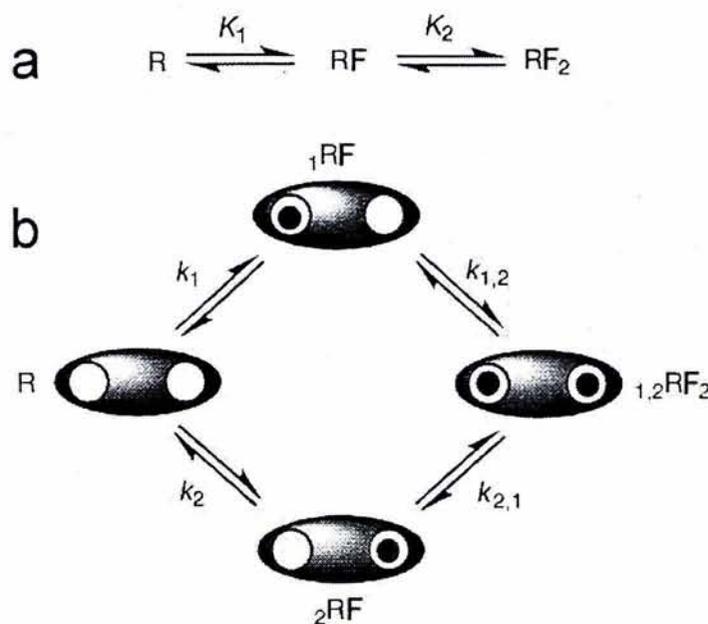


Figura 2. Constantes de afinidad estequiométricas (a) y termodinámicas (b), para un receptor dimérico cuyos sitios presentan interacciones. Las respectivas constantes de afinidad de sitio se denominan  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{1,2}$ ,  $k_{2,1}$ , de acuerdo con la secuencia de ocupación de los sitios por el ligando.

Desde el punto de vista estequiométrico, la ecuación que describe la concentración molar promedio de ligando unido ( $r$ ), puede derivarse para un receptor bivalente como (Klotz, 2001):

$$r = \frac{K_1(F) + 2K_1K_2(F)^2}{1 + K_1(F) + K_1K_2(F)^2} \quad [20]$$

Mediciones experimentales pueden ajustarse analíticamente a esta ecuación para obtener los valores de  $K_1$  y  $K_2$ .

Para un receptor que es saturado por  $\nu$  moles de ligando, la formulación estequiométrica para  $r$  puede obtenerse al extender para  $\nu$  sitios la definición de las constantes de equilibrio estequiométricas en las ecuaciones [8] y [9], para definir  $K_3, K_4, \dots, K_i, \dots, K_\nu$ . De esta forma, por inducción,

$$r = \frac{K_1(L) + 2K_1K_2(L)^2 + 3K_1K_2K_3(L)^3 + \dots + \nu(K_1 \dots K_\nu)(L)^\nu}{1 + K_1(L) + K_1K_2(L)^2 + K_1K_2K_3(L)^3 + \dots + (K_1 \dots K_\nu)(L)^\nu} \quad [21]$$

Debido a que esta ecuación se deriva de principios termodinámicos fenomenológicos independientes de las características moleculares particulares de cada sistema, es válida para todo receptor  $\nu$ -valente, independientemente de la ausencia o presencia de interacciones entre los sitios activos, o bien la naturaleza de dichas interacciones.

Las sucesivas constantes estequiométricas pueden evaluarse a través de la utilización de procedimientos para ajustar la ecuación [21] a datos experimentales.

En un receptor multivalente, la existencia de interacciones entre sus sitios activos se hace evidente al comparar los cambios en las  $K_i$  en pasos sucesivos de ligación. Para un receptor divalente cooperativo, pueden observarse dos diferentes tipos de comportamiento:  $K_2 < K_1$  o bien,  $K_2 > K_1$ .

La cooperatividad es, en el contexto termodinámico, el resultado de la desviación en el  $\Delta G$  de ligación, de aquella que se obtendría de los mismos sitios, si se unieran al ligando de manera independiente. Antes de poder explicar estas interacciones en términos energéticos, es necesario tomar en cuenta que aun cuando todos los sitios presentan afinidades invariantes y sean independientes entre si,

$$K_1 \neq K_2 \neq K_3 \neq \dots$$

[22]

El hecho de que los valores numéricos de estas  $K_i$ s no sean idénticos se hace evidente al considerar un receptor divalente  $R$ . Cuando  $F$  se aproxima a  $R$  para formar  $RF_1$ , el ligando tiene dos sitios disponibles para su unión, mientras que para la reacción



solo queda un sitio disponible (Figs. 1 y 2). La probabilidad de formar  $RL_1$  a partir de  $R$  es mayor que aquella de formar  $RL_2$  de  $RL_1$ , por lo tanto  $K_1$  debe ser mayor que  $K_2$  exclusivamente por este factor estadístico.

Una relación general para determinar las relaciones entre valores de  $K_i$ s sucesivas para cualquier receptor  $v$ -valente, siempre y cuando sus sitios activos sean idénticos e independientes, está dada por la relación (Klotz, 1997)

$$K_i = \frac{v-i+1}{i} k. \quad [24]$$

Esta relación puede ser usada para comparar cuáles de los valores sucesivos de  $K_i$ , tiene una afinidad atenuada y cual incrementada en comparación con un receptor con sitios idénticos e independientes.

## DISTRIBUCIONES DE AFINIDAD

Una gran cantidad de métodos han sido desarrollados para caracterizar poblaciones heterogéneas de receptores en términos de distribuciones de afinidad, que pueden obtenerse directamente de los datos de fijación de ligandos a receptores (Thakur, et al., 1980). La estrategia general, para caracterizar sistemas heterogéneos de receptores, ha sido tradicionalmente, la de determinar la función de densidad de probabilidad de afinidades, la cual se obtiene a partir de las isotermas de fijación. Estas últimas, representan distribuciones de frecuencias acumuladas de la afinidad. Los métodos desarrollados hasta el

momento, tratan con distribuciones de la afinidad específica de los sitios activos (sad, por sus siglas en inglés), las cuales son función de la constante de afinidad intrínseca ( $k$ ) (José & Larralde, 1982; José & José, 1998; Sciutto, et al., 1987; Pauling, et al., 1944; Sips, 1948). Los valores de  $k$ , dependen directamente de la secuencia específica de aminoácidos de los sitios activos, y no pueden medirse directamente. En este contexto, una reacción compleja, puede describirse asumiendo que existen diferentes tipos o clases de sitios activos independientes. Cuantitativamente, un sistema como este, obedecería una ecuación de la forma:

$$r = r(F) = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i F}{1 + k_i F}, \quad [25]$$

en donde  $r$  representa, como en los casos anteriores, la razón de la concentración de ligando unido con respecto a la concentración total de receptor,  $n_i$ , es el número de sitios de la clase  $i$ , y  $k_i$ , es la constante de afinidad intrínseca para la  $i$ ésima clase de receptor. El número total de sitios  $n_0$  esta dado por:

$$n_0 = \sum_{i=1}^m n_i. \quad [26]$$

Si los valores de  $n_i$  se grafican como función del logaritmo de  $k$ , el resultado es el espectro o distribución discreta de afinidades de los sitios activos, que puede utilizarse para caracterizar la reacción. La ecuación [1], representa el modelo de Scatchard para una población de sitios activos heterogéneos e independientes (Scatchard, 1949).

La distribución discreta,  $n_i(k_i)$ , puede reemplazarse por una continua,  $N(k)$ , sin pérdida de generalidad (Thakur, 1980; Hunston, 1975), puesto que el espectro continuo puede estar compuesto de picos muy estrechos que simulan de manera muy cercana al espectro discreto.

De esta forma, para un sistema con sitios heterogéneos e independientes, las ecuaciones [25] y [26] pueden reemplazarse por:

$$r = v \int_0^{\infty} \frac{N(k)kF}{1+kF} dk, \quad [27]$$

con

$$v = \int_{-\infty}^{\infty} N(k)d(\log k), \quad [28]$$

donde  $N(k)$  es la distribución de afinidades de los sitios activos, la cual desconocemos,  $v$  es la valencia del receptor, y  $F$  es la concentración de ligando libre. En esta forma,  $N(k)d(\log k)/v$  representa la probabilidad de que un sitio, seleccionado al azar, tenga una afinidad entre  $\log k$  y  $\log k+d(\log k)$  en una molécula de receptor. En otras palabras,  $N(k)$  define el espectro de afinidades como una función continua del  $\log k$ .

Existen varios métodos dirigidos a encontrar soluciones exactas (Bowman & Aladjem, 1963) o aproximadas a esta ecuación integral, pero estas soluciones, se basan en supuestos muy específicos (Fletcher, et al., 1970; Klotz & Hunston, 1975).

La transformada logarítmica de la isoterma de fijación, resulta ser lineal solo para poblaciones homogéneas de receptores, y cuya distribución de afinidades resulta ser normal, o por lo menos simétrica. Para casos asimétricos, como es el caso de la hemoglobina, y otras moléculas que presentan interacciones entre sus sitios activos, esta transformada se vuelve no lineal tanto a bajas como a altas concentraciones de ligando libre (Hill, 1910). En estos casos, la reacción de unión del ligando, puede caracterizarse también al evaluar  $N(k)$ . La ventaja, es que de esta manera no es necesario suponer un valor específico para  $v$ .

A pesar de que en la práctica, no es posible utilizar una solución exacta para  $N(k)$ , existen varias técnicas de aproximación numéricas disponibles (Thakur, et al., 1980; Hunston, 1975). Recientemente se ha desarrollado un enfoque estadístico para caracterizar las distribuciones de afinidad

estequiométricas (SAD) de poblaciones heterogéneas de receptores (José & José, 1998; José & José, 2001). Estas distribuciones termodinámicas son densidades marginales, que pueden ser usadas para descomponer el proceso de fijación de ligandos en distribuciones de afinidad que corresponden a la formación secuencial de complejos de receptor-ligando con uno, dos o  $v$  sitios ocupados. La importancia de estas distribuciones es que pueden relacionarse con cantidades medidas experimentalmente, y representan distribuciones de afinidad para cada paso de fijación. Más aun, estas distribuciones pueden aplicarse tanto a casos donde existen interacciones positivas o negativas entre los sitios, o bien en ausencia de dichas interacciones, cuando los sitios son independientes.

La hemoglobina ha sido extensamente estudiada como un prototipo clásico de ensamblajes moleculares que sufren un cambio conformacional y funcional como respuesta a la fijación de diversos ligandos (Perutz, 1970; Perutz, 1989). En la hemoglobina, como en muchas proteínas alostéricas, el análisis directo de los datos experimentales, se complica por las interacciones que se generan entre los sitios durante el proceso de saturación. La naturaleza altamente cooperativa de la isoterma de fijación del  $O_2$  a la hemoglobina, suprime las contribuciones de las especies moleculares en estados intermedios de ligación, haciendo que sea muy difícil, discriminar entre los diferentes modelos de cooperatividad (Koshland, et al., 1966; Monod, et al., 1965; Di Cera, 1995). Como se mencionó anteriormente, la curva sigmoide de fijación del  $O_2$  a la hemoglobina, es consistente con diferentes modelos de cooperatividad (Koshland, et al., 1966). Puesto que la hemoglobina opera *in vivo* esencialmente como un sistema termodinámico en equilibrio, el problema de delinear las relaciones entre su estructura y su función, resulta en aquella de establecer relaciones entre cambios en las propiedades termodinámicas y estructurales que acompañan el ciclo funcional de oxigenación y desoxigenación de la molécula.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo es obtener las sads y SADs para la reacción de la hemoglobina con  $CO$  y  $O_2$ , utilizando para ello un método de aproximación por diferencias finitas (Hunston, 1975; Ninomiya & Ferry, 1959;

Ferry, 1970), que se ha demostrado, resulta útil para distribuciones con formas arbitrarias (Thakur, et al., 1980), como aquellas que resultan de reacciones que involucran interacciones entre sitios activos.

A pesar de que nos enfocamos en el caso particular de la hemoglobina, este es un método general, que puede ser utilizado para analizar sistemas de interacción entre ligandos y receptores multivalentes que presenten interacciones positivas o negativas, o bien, cuando dichos receptores posean sitios independientes.

### **LA HEMOGLOBINA: el paradigma alostérico**

Las proteínas alostéricas controlan y coordinan una gran cantidad de eventos químicos en la célula viva. La inducción de cambios conformacionales específicos, inducidos por la fijación de ligandos a receptores, es un fenómeno clave que permite el desarrollo de la vida. Cuando Monod concibió la idea del alosterismo, dijo que había descubierto el segundo secreto de la vida. El primero era la estructura del DNA.

La teoría, tal como fue publicada por Monod, Changeux y Jacob, (Monod, et al., 1963), trataba principalmente sobre la cooperatividad y la inhibición por producto de algunas enzimas. Dos años más tarde, la teoría alostérica fue formalizada por Monod, Wyman y Changeux, y es referida simplemente como MWC (Monod, et al., 1965).

Nuestra exploración de la estructura y función de la hemoglobina (Hb) continúa con la discusión teórica sobre la regulación de la unión de ligandos a proteínas a través de interacciones alostéricas (del griego *allos*, otro y *stereos*, sólido o espacio). Estas interacciones cooperativas ocurren cuando la unión de un ligando a un sitio específico es influenciada o modificada por la unión de otro ligando, denominado efector o modulador, a un sitio diferente (alostérico) en la misma proteína. Si los ligandos son idénticos, estas interacciones se denominan homotrópicas, mientras que si los ligandos son diferentes se denominan heterotrópicas. Estos efectos se clasifican además, en positivos o negativos,

dependiendo de si aumentan o disminuyen la afinidad de la proteína por el ligando.

La hemoglobina transporta el  $O_2$  de los pulmones, agallas y piel de los vertebrados a los capilares para su utilización en la respiración celular. La velocidad de difusión de una molécula como el  $O_2$  a través de los tejidos varía de manera inversa al cuadrado de la distancia que debe recorrer, por lo que la difusión del mismo a través de un tejido cuyo grosor sea mayor a 1 mm es demasiado lenta para sostener la vida. El desarrollo de moléculas transportadoras de  $O_2$  fue necesario para poder satisfacer las necesidades metabólicas contrarrestando la limitación impuesta por la baja solubilidad del  $O_2$  en el agua ( $\sim 10^{-4}$  M bajo condiciones fisiológicas). La sangre, que normalmente contiene aproximadamente  $150 \text{ gL}^{-1}$  de hemoglobina, puede transportar concentraciones de  $O_2$  tan altas como 0.01M, que es aproximadamente la misma del aire.

La hemoglobina de los vertebrados es un tetrámero formado por dos pares de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , dispuestas simétricamente entorno a una cavidad central en contacto con el solvente. Las cuatro cadenas se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada cadena tiene un grupo hemo, el cual constituye el sitio de unión al  $O_2$ .

La molécula de hemoglobina es casi esférica, con un diámetro aproximado de 55 Å, y un peso molecular de 64,500 (Perutz, et al., 1998). Las cuatro cadenas están empaquetadas conjuntamente en una disposición tetraédrica (Fig. 3). Los grupos hemo están localizados en unas oquedades cercanas al exterior de la molécula, uno en cada subunidad. Los cuatro sitios de unión al  $O_2$  están separados. La distancia entre los dos grupos hemo mas cercanos es de 25 Å. Cada cadena  $\alpha$  está en contacto con las dos cadenas  $\beta$ , pero existen pocas interacciones entre las dos cadenas  $\alpha$  o las dos cadenas  $\beta$  entre si.

Las subunidades  $\alpha$  están compuestas de 141 residuos de aminoácidos, mientras que las  $\beta$  contienen 146. Las cadenas  $\alpha$  presentan 7 segmentos



La unión del O<sub>2</sub> a la hemoglobina está regulada además del mismo O<sub>2</sub> por la concentración de H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub> y fosfatos orgánicos tales como el 2,3 bifosfoglicerato (BPG). Estos reguladores alteran la capacidad de unión del O<sub>2</sub> a la hemoglobina, enlazándose a centros de unión distintos y distantes del sitio de unión del O<sub>2</sub> a la proteína.

## EL HEMO

La capacidad de la hemoglobina para enlazar O<sub>2</sub>, depende de la presencia de una unidad no polipeptídica, denominada grupo hemo. El lugar de enlace al O<sub>2</sub> supone solamente una pequeña fracción del volumen de cada subunidad de la hemoglobina.

El hemo consta de una parte orgánica, la protoporfirina y de un átomo de hierro (Fe) (Fig. 4). La protoporfirina esta formada por cuatro grupos pirrólicos. Los cuatro pirroles están unidos por medio de puentes metino para formar un anillo tetrapirrólico. Al anillo tetrapirrólico están enlazados cuatro metilos, dos vinilos, y dos cadenas laterales de propionato. Estos sustituyentes pueden estar dispuestos de quince maneras diferentes, pero solamente uno de estos isómeros, denominado protoporfirina IX, esta presente en los sistemas biológicos.

El átomo de Fe está ligado a los cuatro nitrógenos en el centro del anillo de la porfirina (Fig. 5). El Fe puede formar otros dos enlaces, uno a cada lado del plano del hemo, en la 5ª y la 6ª posición de coordinación. El átomo de Fe del hemo puede estar en estado de oxidación ferroso (+2) o férrico (+3). Las formas correspondientes de la hemoglobina se denominan ferrohémoglobina y ferrihémoglobina, respectivamente. La ferrihémoglobina también se denomina metahémoglobina. Solamente la ferrohémoglobina, correspondiente a la forma de oxidación +2, puede captar O<sub>2</sub>.

En cada subunidad de la hemoglobina, el interior y el exterior están bien definidos. El interior consiste casi enteramente de residuos no polares como la leucina, valina, metionina y fenilalanina. No hay cadenas laterales de ácidos glutámico y aspártico, glutamina, asparagina, lisina o arginina en el interior de la

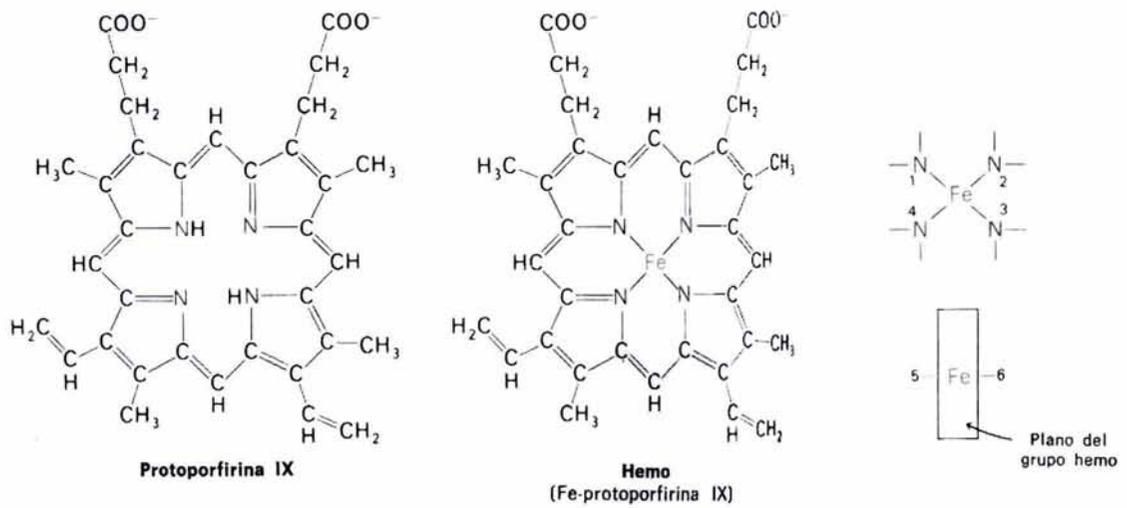


Figura 4. Grupo hemo. El átomo de Fe está ligado a los cuatro nitrógenos en el centro del anillo de la protoporfirina y puede formar dos enlaces más, uno a cada lado del plano del hemo.

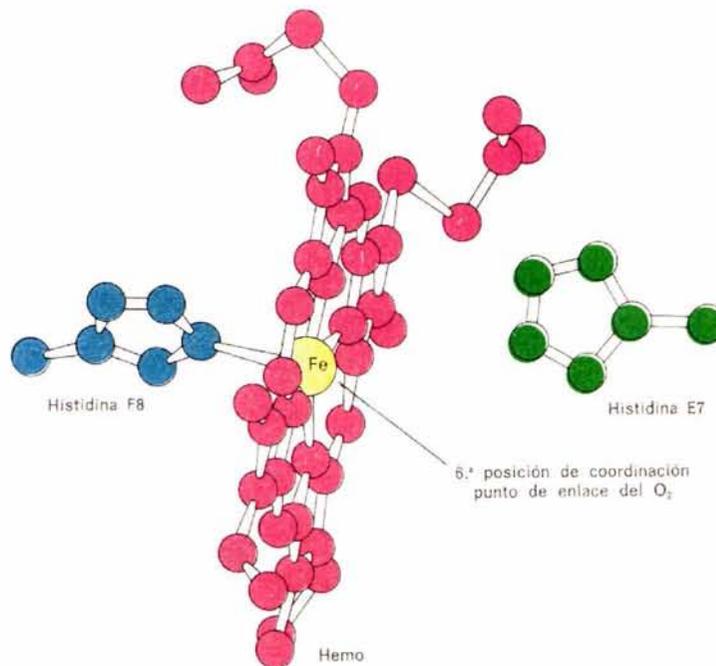


Figura 5. Modelo del grupo hemo. La 5ª posición de coordinación está ocupada por la histidina proximal (F8), mientras que el sitio de unión al O<sub>2</sub> se encuentra del otro lado, cerca de la histidina distal (E7).

molécula. Los residuos que tienen a la vez parte polar y no polar, como la treonina, la tirosina y el triptofano, están orientados de tal forma, que sus porciones apolares apuntan hacia el interior. Los únicos residuos polares en el interior de cada subunidad, son dos histidinas que tienen una función crítica. El exterior de cada subunidad contiene a la vez residuos polares y apolares.

El grupo hemo queda localizado en una oquedad dentro de cada subunidad. Las cadenas laterales altamente polares de propionato del hemo se ubican en la superficie de la molécula. A pH fisiológico, los grupos carboxilo del propionato están ionizados. El resto del hemo queda en el interior, donde queda rodeado por residuos apolares excepto por las dos histidinas. El átomo de Fe del hemo está directamente enlazado a una de estas histidinas (fig. 5). Esta histidina, que ocupa la 5ª posición de coordinación, se denomina histidina proximal. El átomo de Fe queda alrededor de unos 0.3 Å fuera del plano de la porfirina, del mismo lado de la histidina F8. El centro de enlace al O<sub>2</sub> queda justamente del otro lado del plano del hemo, en la 6ª posición de coordinación. Un segundo residuo de histidina (E7), denominada histidina distal, queda próximo al hemo. El átomo de Fe del hemo presenta un contacto de van der Waals con esta histidina.

Los átomos de Fe en estado ferroso se combinan reversiblemente con el O<sub>2</sub> para formar complejos dioxigenados, y en el proceso cambian de alto a bajo spin.

El sitio de enlace con el O<sub>2</sub> supone solamente una pequeña fracción del volumen de cada subunidad de la hemoglobina. El intrincado plegamiento de la globina corresponde al diseño fundamental de la naturaleza para un transportador de O<sub>2</sub>, ya que sitúa al hemo en un entorno no polar que lo aísla de los otros grupos hemo, y lo capacita para transportar O<sub>2</sub> de forma reversible.

### **LA UNIÓN DEL O<sub>2</sub> A LA HEMOGLOBINA ES COOPERATIVA**

Si definimos la función de saturación fraccional,  $Y$ , como la fracción de sitios ocupados,

$$Y = \frac{r}{v}. \quad [29]$$

El valor de  $Y$  puede tomar valores continuos entre cero y uno.

En 1910 Archibald Hill demostró que la curva obtenida de los datos de oxigenación de la hemoglobina describe una curva sigmoide que puede ajustarse con la ecuación que se deriva del equilibrio hipotético (Hill, 1910; Klotz, 2001):



Esta expresión da lugar a:

$$Y = \frac{(PO_2)^n}{(PO_2)^n + (P_{50})^n}, \quad [31]$$

donde  $PO_2$  es la presión parcial de  $O_2$ , y  $P_{50}$  es la presión parcial de  $O_2$  al 50% de saturación. La afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$  puede caracterizarse por este parámetro, ya que representa la concentración de  $O_2$  a la cual, el 50% de los sitios están ocupados ( $Y=0.5$ ).

La transformada logarítmica de la ecuación [31] da lugar a:

$$\frac{Y}{1-Y} = n \log \left( \frac{PO_2}{P_{50}} \right) = \log K + n \log [O_2]. \quad [32]$$

La ecuación [32] se conoce como la ecuación de Hill. Esta es una ecuación empírica, que describe fenomenológicamente la saturación, en este caso, de la hemoglobina.

La pendiente de esta recta, ( $n$ ), es el coeficiente de Hill. El valor de  $n$  aumenta con el grado de cooperatividad, y para el caso de la Hb es aproximadamente 2.5 (Klotz, 2001).

Un valor de  $n=1$  significa que las moléculas de ligando se unen a la molécula receptora de manera independiente, mientras que un valor diferente de 1 indica

la presencia de interacciones entre los sitios activos de moléculas multivalentes. Cuando  $n > 1$ , dichas interacciones son positivas, esto es, que la unión de una molécula de ligando facilita la unión de una subsiguiente (aumenta la afinidad), mientras que valores de  $n$  menores que 1 indican la presencia de interacciones negativas entre los sitios. En este caso, la unión de un ligando disminuye la afinidad de los sitios que quedan libres.

El significado teórico del coeficiente de Hill se sigue discutiendo. Aun en el caso de la hemoglobina, un sistema particularmente favorable para su aplicación, las mediciones experimentales dan un valor no integral para  $n$  que no concuerda con la interpretación clásica sobre la valencia de la proteína. Otras interpretaciones lo utilizan como un indicador del número de sitios interactuantes, o bien, como un índice del grado de cooperatividad entre las diferentes subunidades de la proteína en cuestión, ya que su valor aumenta en proporción directa a la cooperatividad y viceversa.

A pesar de la generalizada utilización de la ecuación [31], la correlación directa de esta con resultados experimentales exige alcanzar la saturación total del receptor (Klotz, 2001), lo que no siempre es posible lograr experimentalmente.

Por otro lado, para receptores multivalentes, como es el caso de la hemoglobina, la ecuación [30] resulta una representación demasiado simplista del sistema, ya que como se ha mencionado, la unión del ligando ocurre generalmente en pasos sucesivos, cada uno con una correspondiente constante de equilibrio, lo que a su vez, obliga a considerar las constantes de afinidad de sitio y las termodinámicas.

La unión cooperativa del  $O_2$  a la hemoglobina hace que esta proteína sea un transportador de  $O_2$  muy eficiente. Las interacciones moleculares que se generan como función del grado de oxigenación le permiten liberar 1.83 veces más  $O_2$  del que podría liberar una molécula tetraédrica similar con cuatro sitios independientes.

Otros factores afectan o regulan la unión y liberación del  $O_2$  a la hemoglobina. La acidez estimula la liberación de  $O_2$ . Dentro de los márgenes fisiológicos, una

disminución del pH cambia la curva de disociación del  $O_2$  hacia la derecha, es decir, se reduce la afinidad por el  $O_2$ . Al aumentar la concentración de  $CO_2$ , a pH constante, la afinidad por el  $O_2$  también disminuye. La presencia de niveles elevados de  $CO_2$  y  $H^+$  en los capilares de los tejidos metabólicamente activos, favorece la liberación del  $O_2$  de la hemoglobina. Cada molécula de hemoglobina une un  $H^+$  por cada dos moléculas de  $O_2$  que se liberan, este intercambio desvía el equilibrio de la reacción entre el  $CO_2$  y el  $H_2O$  en la dirección de  $HCO^-$ , lo que promueve el transporte de  $CO_2$  por el plasma sanguíneo. Este importante mecanismo para cubrir las elevadas necesidades de  $O_2$  de los tejidos metabólicamente activos fue descubierto por Christian Bohr en 1904 (Klotz, 2001).

El efecto recíproco, descubierto diez años más tarde por John S. Haldane (Klotz, 2001), tiene lugar en los capilares de los alvéolos pulmonares. La elevada concentración de  $O_2$  libera los  $H^+$  y el  $CO_2$  de la Hb, de la misma manera en que las elevadas concentraciones de  $H^+$  y de  $CO_2$  liberan el  $O_2$  en los tejidos activos. Las relaciones entre la unión del  $O_2$ , el  $H^+$  y el  $CO_2$  se conocen como efecto Bohr.

La afinidad de la hemoglobina en los glóbulos rojos por el  $O_2$  es menor que la afinidad de la hemoglobina en solución libre. Reinhold Benesch y Ruth Benesch (Benesch & Benesch, 1969) demostraron en 1967 que el 2,3-bifosfoglicerato (BPG) se une a la hemoglobina y tiene un efecto sobre la afinidad por el  $O_2$ . El BPG se encuentra en los eritrocitos humanos y de muchas otras especies, a la misma concentración molar que la hemoglobina. En ausencia del BPG, el  $P_{50}$  de la hemoglobina es de 1 torr, mientras que en su presencia, el  $P_{50}$  llega hasta 26 torrs. El BPG reduce hasta 26 veces la afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$  lo cual es esencial para favorecer la liberación del  $O_2$  en los capilares de los tejidos. El BPG se une a la desoxihemoglobina, pero no a la oxihemoglobina.

En el caso de la hemoglobina fetal (Hb F), que se oxigena a expensas de la hemoglobina adulta (Hb A) en la circulación placentaria, la Hb F se une al BPG con menor fuerza que la Hb A, lo que se refleja como una mayor afinidad por el

O<sub>2</sub>. Ciertamente, en ausencia de BPG, las afinidades por el O<sub>2</sub> de ambas hemoglobinas están en orden inverso.

El BPG se une específicamente a la desoxiHb en la proporción de un BPG por cada tetrámero. El BPG se une sobre el eje de simetría de la molécula de la hemoglobina, en la cavidad central, donde las cuatro subunidades están más próximas unas a otras (figura 6). El sitio de enlace para el BPG está constituido por 3 residuos cargados positivamente en cada cadena  $\beta$ : el grupo  $\alpha$ -amino, la lisina EF6 y la histidina H21. Estos grupos interactúan con el BPG, que presenta cuatro cargas negativas a pH fisiológico. El BPG es complementario estereoquímicamente a una constelación de estos seis grupos positivamente cargados en las cadenas  $\beta$  que quedan situadas en la cavidad central de la molécula de hemoglobina (fig 6).

El BPG se enlaza más débilmente a la Hb F que a la HB A porque el residuo H21 en la HB F es una serina, en lugar de una histidina.

## **AFINIDAD Y ESTRUCTURA**

Consideremos ahora la base estructural de los efectos alostéricos. La hemoglobina puede disociarse en sus cadenas constitutivas. La cadena  $\alpha$  por sí misma tiene una elevada afinidad por el O<sub>2</sub>, una curva de asociación hiperbólica, y características de unión al O<sub>2</sub> independientes del pH, la concentración de CO<sub>2</sub> y del nivel de BPG. La cadena  $\beta$  aislada forma fácilmente un tetrámero,  $\beta_4$ , que se ha denominado hemoglobina H. Al igual que la cadena  $\alpha$  y la mioglobina (Mb), el tetrámero  $\beta_4$  carece totalmente de las propiedades alostéricas de la hemoglobina y tiene alta afinidad por el O<sub>2</sub>. Las propiedades alostéricas de la hemoglobina son producto de la interacción de subunidades diferentes.

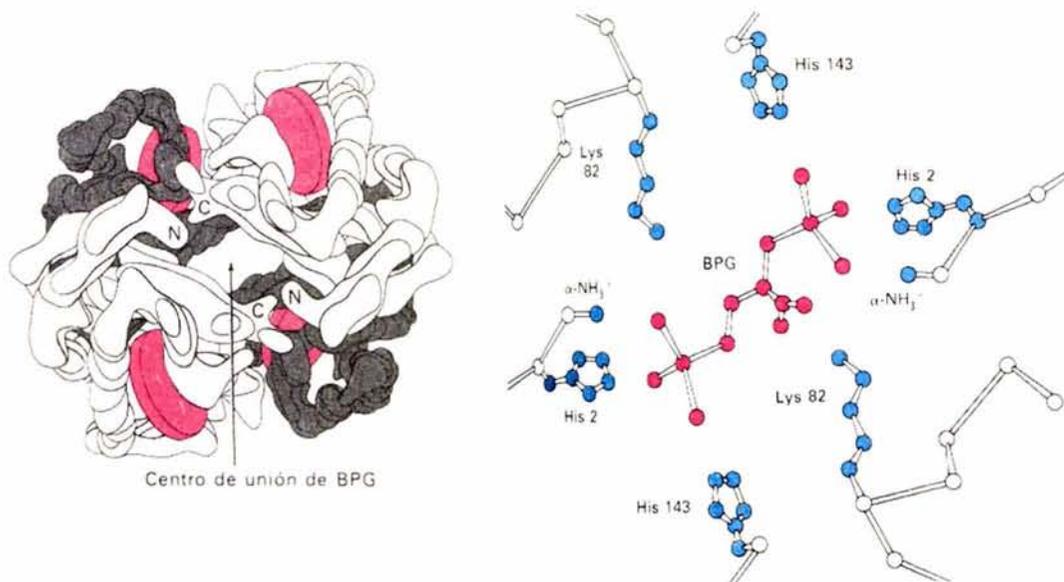


Figura 6. El sitio de unión al BPG esta en la cavidad central de la desoxihemoglobina. El BPG interacciona con tres grupos positivamente cargados en cada cadena  $\beta$ . (Tomado de Perutz, M.F., 1964, Scientific American, y Arnone, A., 1972, Nature).

La ecuación [32] es válida solamente para la región comprendida en la parte media de la curva de equilibrio sigmoide, que corresponde a la región donde  $n \neq 1$ , y no considera la unión secuencial del ligando. Adair derivó posteriormente una ecuación exacta con cuatro constantes de asociación  $A_i$ , conocidas como las constantes de Adair (Adair, 1925), las cuales representan las constantes de equilibrio para los cuatro pasos secuenciales de unión del  $O_2$  a la hemoglobina:

$$K_1 = \frac{[Hb(O_2)]}{[Hb] \times p}, \quad K_2 = \frac{[Hb(O_2)_2]}{[Hb(O_2)] \times p}, \quad [33]$$

etc., de tal forma que

$$Y = \frac{(K_1 p O_2 + 2K_1 K_2 p O_2^2 + 3K_1 K_2 K_3 p O_2^3 + 4K_1 K_2 K_3 K_4 p O_2^4)}{4(1 + K_1 p O_2 + K_1 K_2 p O_2^2 + K_1 K_2 K_3 p O_2^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 p O_2^4)}. \quad [34]$$

La estructura cristalográfica de la hemoglobina cambia notablemente con el grado de oxigenación. Los estudios cristalográficos por rayos X han demostrado que la oxi y desoxihemoglobina difieren claramente en su estructura cuaternaria. La molécula oxigenada es más compacta, por lo que la distancia entre los átomos de Fe decrece. Los cambios en las regiones de contacto entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son de particular interés. Existen dos regiones de contacto entre las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Uno de los tipos de contacto es el  $\alpha_1\beta_1$  (que es idéntico al  $\alpha_2\beta_2$ ), y el otro es el  $\alpha_1\beta_2$  (idéntico al  $\alpha_2\beta_1$ ). Durante la oxigenación una pareja de subunidades  $\alpha_1\beta_1$ , (o  $\alpha_2\beta_2$ ), gira con respecto a la otra pareja en un ángulo de

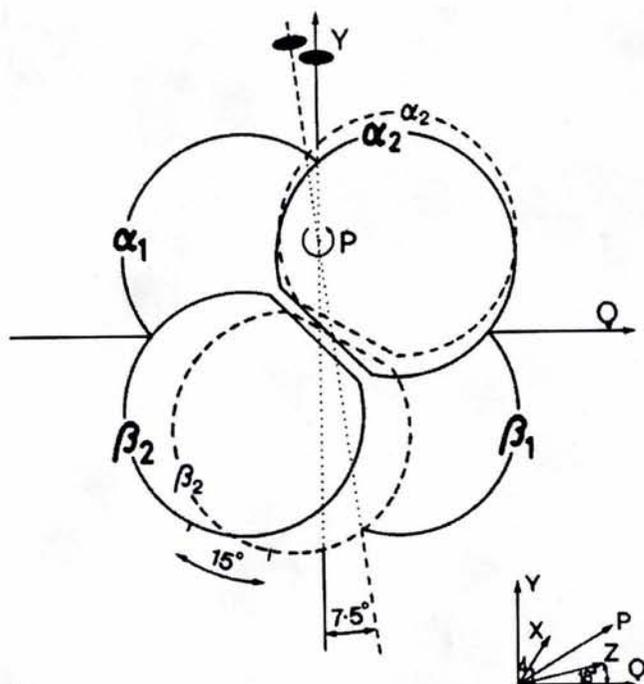


Figura 7. La unión del  $O_2$  produce el movimiento de un par de subunidades con respecto al otro. En el diagrama se han superimpuesto los dímeros  $\alpha_1\beta_1$  oxigenado y libre. El dímero  $\alpha_2\beta_2$  ligado al  $O_2$  rota con respecto al libre en un ángulo de  $12-15^\circ$  hacia el eje P, y sufre un desplazamiento sobre este mismo eje (el cual es perpendicular a los ejes de simetría Y y Q) de  $1 \text{ \AA}$  hacia abajo. Las líneas continuas indican la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina, y las quebradas de la oxihemoglobina.

$12$  a  $15^\circ$  (Fig 7), y algunos átomos de la interfase se desplazan hasta  $6 \text{ \AA}$ .

La región de contacto  $\alpha_1\beta_2$  parece estar diseñada para actuar como un interruptor entre dos estructuras alternativas. Las dos formas de ensamblaje de la interfase  $\alpha_1\beta_2$  se estabilizan por enlaces de hidrógeno (Figura 8). El contacto  $\alpha_1\beta_2$  se encuentra cercano a los grupos hemo de estas subunidades, por lo que los cambios estructurales en esta región afectan directamente a los hemos. La importancia del contacto  $\alpha_1\beta_2$  queda reforzada por el descubrimiento de que muchos de los residuos en esta región son universales en todas las especies

animales. Casi todas las mutaciones del contacto  $\alpha_1\beta_2$  disminuyen las interacciones hemo-hemo, mientras que las mutaciones en el contacto  $\alpha_1\beta_1$  no lo hacen.

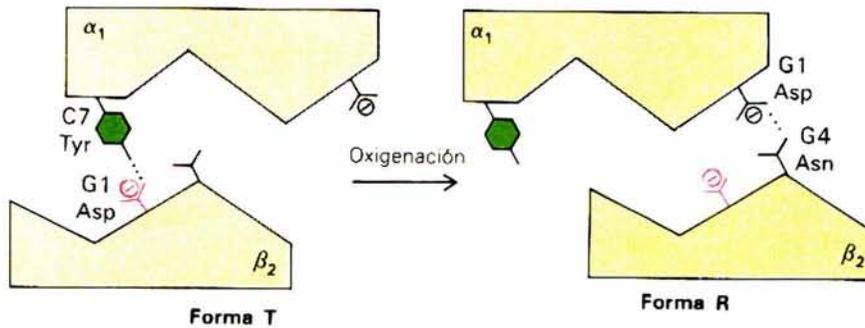


Figura 8. La interfase  $\alpha_1\beta_2$  cambia de la forma T a la R, en la oxigenación. Esta interfase permite a las dos subunidades deslizarse una con respecto a la otra.

En la estructura de la oxihemoglobina, el átomo de Fe de los grupos hemo tiene ocupada la 6ª posición de coordinación. Esta estructura es la misma, sin importar la naturaleza del ligando que se une al hemo en esta 6ª posición, ni la valencia y el spin del Fe (Perutz, et al., 1998). En la estructura de la desoxihb, los átomos de Fe de los grupos hemo tienen libre la 6ª posición de coordinación, están en estado ferroso y con alto spin.

En la oxihemoglobina los residuos carboxilo-terminales de las cuatro cadenas polipeptídicas tienen casi completa libertad de rotación. En cambio, estos grupos terminales están inmovilizados en la desoxihemoglobina, (figura 9). En la desoxihemoglobina, estos grupos, así como los residuos C-terminales de las cadenas laterales, participan en la formación de enlaces salinos, que constituyen interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura molecular.

La desoxihemoglobina es una molécula tensa, más contraída que la oxihemoglobina, a causa de estos ocho enlaces salinos. Por esta razón, la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina se ha denominado forma T (tensa), mientras que la estructura de la oxihemoglobina se ha llamado forma R (relajada). Las denominaciones R y T se utilizan universalmente para describir

estructuras cuaternarias alternativas de las proteínas alostéricas, de modo que la forma T es la de menor afinidad por el sustrato.

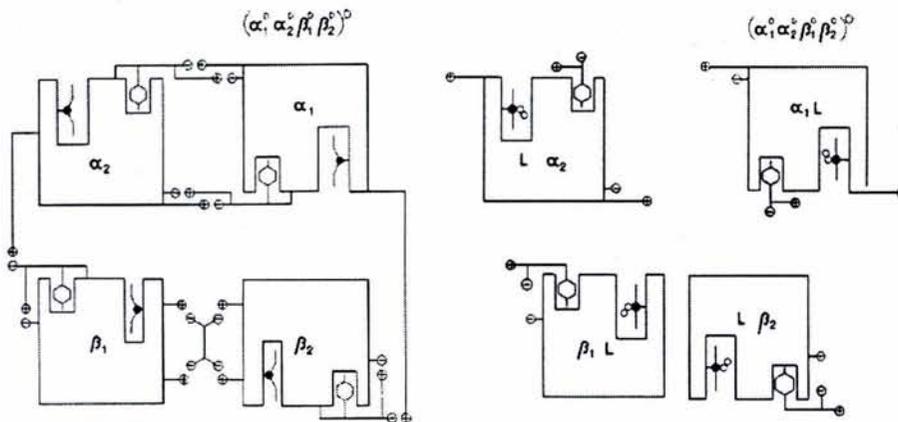


Figura 9. Diagrama de los cambios en los puentes salinos de los residuos carboxilo terminal de la estructura T tras la oxigenación. La estructura T está indicada por la letra D, designando el estado desoxigenado, y la R por la letra O. Las subunidades unidas al ligando están también marcadas con la letra L.

En la hemoglobina, la afinidad por el  $O_2$  de la estructura R es ligeramente mayor que el promedio de las correspondientes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  libres; mientras que aquella de la estructura T es menor que esta por un factor equivalente a la energía libre de cooperatividad (Perutz, et al., 1998).

Los cambios conformacionales discutidos con anterioridad, tienen lugar a una cierta distancia del grupo hemo, pero en este centro también ocurren cambios importantes. En la desoxihemoglobina, el átomo de Fe está a unos 0.4 Å fuera del plano del hemo por el lado de la histidina proximal, de manera que el grupo hemo queda curvado en el mismo sentido. En la oxigenación, el átomo de Fe se introduce en el plano de la porfirina de modo que pueda formar un enlace fuerte con el  $O_2$ , y el hemo se vuelve más plano.

Al parecer, la introducción del átomo de Fe en el plano del hemo favorece el cambio de la estructura cuaternaria de la forma T a la R. Una cadena lateral clave en la transmisión del cambio estructural desde el hemo de una subunidad a las otras subunidades, es la histidina proximal que es arrastrada por el átomo de Fe en su desplazamiento. Este cambio en la histidina F8 provoca una

alteración de la estructura de la hélice F y los acodamientos EF y FG (figura10). Estos cambios conformacionales se transmiten a la superficie externa de la subunidad, ocasionando la ruptura de los enlaces salinos intercatenarios (fig 9). En consecuencia, la oxigenación desplaza el equilibrio entre las dos estructuras cuaternarias hacia la forma R. Así, un cambio conformacional dentro de una subunidad debida a la oxigenación, se traduce en cambios estructurales en la interfase entre las subunidades.

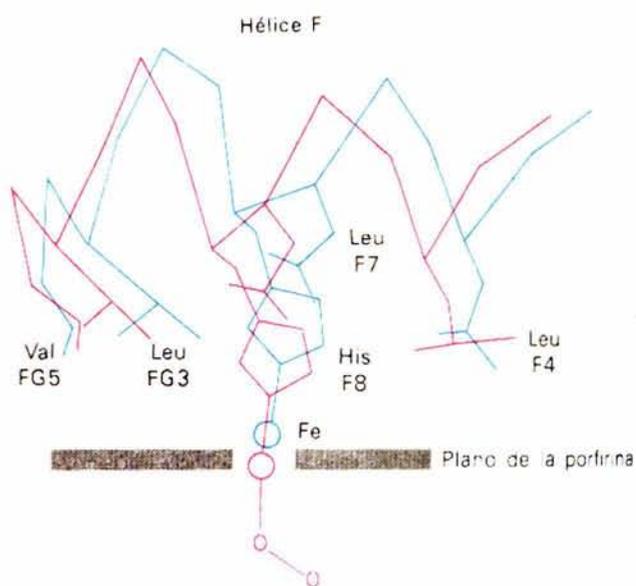


Figura 10. Cambios conformacionales inducidos por el movimiento del átomo de Fe en la oxigenación. La estructura oxigenada se representa en rojo y la desoxigenada en azul. (Baldwin J. & Chotia C., 1979, J. Mol. Biol.).

En 1972, Perutz (Perutz, 1972; Perutz, et al, 1998) propuso que la interacción hemo-hemo, es decir, la cooperatividad, consiste en un cambio en la tensión en el hemo, que se produce por la transición entre dos estructuras alternativas de la globina. Perutz atribuyó la baja afinidad de la estructura T por el  $O_2$  a la tensión ejercida por las histidinas proximales, las cuales restringen el movimiento del átomo de Fe de su posición fuera del plano de la porfirina en la desoxihemoglobina a su posición en el plano en la oxihemoglobina. Estudios recientes sobre la estructura de diversas hemoglobinas con bajo spin, unidas a diferentes ligandos, han demostrado que la tensión generada en las subunidades  $\alpha$  es suficientemente fuerte para romper el enlace entre el átomo de Fe y la histidina proximal. La ausencia de cooperatividad en hemoglobinas mutadas, en las cuales, las histidinas proximales han sido substituídas por

glicinas, y las cadenas laterales de dichas histidinas se han reemplazado por grupos imidazol, han demostrado un papel esencial del enlace Fe-histidina, en la transmisión del movimiento del hemo al resto de la globina (Perutz, et al., 1998).

En el modelo propuesto por Perutz (Perutz et al., 1998), la oxigenación no se puede producir, a menos de que algunos de los 8 enlaces salinos se rompan, de forma que el átomo de hierro pueda moverse hacia el plano del grupo hemo. El número de enlaces salinos que se necesita romper para enlazar una molécula de  $O_2$  depende de que esta sea la primera, la segunda, la tercera o la cuarta que se une. Deben romperse más enlaces salinos para permitir la entrada del primer  $O_2$  que para los siguientes. Puesto que se requiere energía para romper los enlaces salinos, la unión del primer  $O_2$  es menos favorable energéticamente que la unión de las siguientes. En este esquema, la afinidad de la segunda y tercera moléculas de  $O_2$  es intermedia entre la primera y la última. Este aumento secuencial de la afinidad por el  $O_2$  justificaría la curva sigmoideal de unión del  $O_2$  que se observa experimentalmente.

## **REGULACION ALOSTERICA**

La hemoglobina, exhibe tanto efectos homotrópicos como heterotrópicos. Como se ha mencionado, la unión del  $O_2$  resulta en un efecto homotrópico positivo al aumentar la afinidad, mientras que el BPG,  $CO_2$ ,  $H^+$ , entre otros, son efectores heterotrópicos negativos, al disminuir la afinidad de la macromolécula por el  $O_2$ . Como se ha mencionado, la afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$  parece depender directamente de su estructura cuaternaria. En general, los efectos alostéricos resultan de interacciones entre las diferentes subunidades de proteínas oligoméricas.

Aun cuando la hemoglobina no cataliza ninguna reacción química, esta se une a sus ligandos de la misma manera en que lo hace una enzima. Puesto que una enzima no puede catalizar una reacción sino hasta después de que se ha unido a su sustrato, la tasa o la velocidad catalítica de la enzima varía o depende directamente de su afinidad por el sustrato. A continuación se analizarán los dos

principales modelos sobre la regulación alostérica, que en gran parte fueron formulados para explicar la unión cooperativa del O<sub>2</sub> a la hemoglobina.

## **EL MODELO MWC O EL MODELO DE SIMETRÍA**

En 1965, la teoría alostérica inicialmente propuesta por Monod, Changeux y Jacob (Monod, et al., 1963) fue formalizada en un modelo clásico por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux, y es conocida como el modelo MWC (Monod, et al., 1965).

El modelo MWC, también llamado modelo de simetría o modelo concertado, sostiene que la cooperatividad observada en la unión específica de un sustrato a una enzima, así como la modificación de la acción enzimática por metabolitos que no tienen una relación estereoquímica aparente ni con el sustrato ni con el producto de la reacción de dicha enzima, puede observarse en proteínas que están constituidas por varias subunidades simétricamente arregladas. El modelo plantea que la macromolécula puede existir en 2 o más diferentes estados conformacionales (2 estructuras cuaternarias diferentes). Estas estructuras pueden diferir en el arreglo de las subunidades que componen al oligomero, así como en el número y la energía de los enlaces entre ellas. En una de estas estructuras, las subunidades están constreñidas por fuertes enlaces que pueden resistir los cambios terciarios necesarios para la unión del sustrato. Denominaron a esta estructura "T" debido a que estos enlaces la vuelven una estructura tensa. En la otra configuración, algunos de estos enlaces se han roto, "relajando" la estructura, por lo que la llamaron "R". En la transición de una a otra, la simetría de la molécula debe conservarse, de tal manera que la actividad de todas las subunidades sea igualmente baja o igualmente alta.

El modelo MWC propone que las enzimas alostéricas tienen la ventaja biológica de que no es necesaria ninguna interacción directa entre el sustrato de la proteína y un metabolito regulador que controle su actividad, porque este control se lleva a cabo a través del cambio en la estructura misma de la proteína, inducido cuando esta se une a su efector específico.

El modelo de simetría puede definirse por el siguiente conjunto de reglas:

1.. Una proteína alostérica es un oligómero de protómeros que están simétricamente relacionados. En el caso de la hemoglobina, asumiremos que las cuatro subunidades son funcionalmente idénticas.

2.. Cada protomero puede existir en por lo menos dos estados conformacionales diferentes, designados T y R. La forma R tiene una mayor afinidad por el sustrato que la forma T. Estos estados están en equilibrio independientemente de que el ligando esté unido o no al oligomero.

3.. El ligando puede unirse a un protómero en cualquiera de sus conformaciones. Solamente el cambio conformacional altera la afinidad del protómero por el ligando.

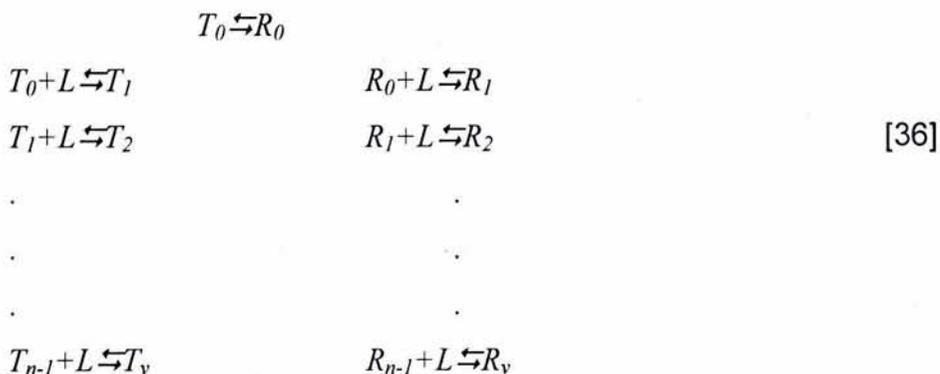
4..La simetría molecular de la proteína debe conservarse durante el cambio conformacional. De esta forma, los protómeros deben cambiar su conformación de manera concertada, lo que implica que la conformación de cada protomero está limitada por sus asociaciones con el resto. En otras palabras, no pueden existir oligomeros que simultáneamente contengan subunidades en estado R y en estado T.

De manera general, para un ligando  $F$  y una proteína alostérica de valencia  $v$ , las reglas antes mencionadas implican el siguiente equilibrio tanto para la conversión conformacional de un estado a otro, como para la unión sucesiva de los ligandos (figura 11).

Si establecemos la igualdad

$$T_i \rightleftharpoons TL_i, \text{ y } R_i \rightleftharpoons RL_i, \quad [35]$$

Entonces, el equilibrio puede representarse como



En ausencia de sustrato, la relación entre las concentraciones de los dos estados, simbolizados como  $T_0$  y  $R_0$  respectivamente, está dada por

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]}. \quad [37]$$

$L$  es la constante alostérica que define la tasa de interconversión conformacional entre los dos estados de la proteína en ausencia de ligando.

La constante de afinidad intrínseca para el estado R,  $k_R$ , que según la regla 3, es independiente del número de ligandos unidos a la proteína en el estado R, está definida por

$$k_R = \left( \frac{v-i+1}{i} \right) \frac{[R_i]}{[R_{i-1}][L]}, \quad [38]$$

donde  $i=1,2,3,\dots,v$ . La constante de afinidad de sitio,  $k_T$  para la unión del ligando al estado T se define de manera similar.

La fracción de sitios ocupados o saturación fraccional, en este caso está dada por la ecuación,

$$Y = \frac{([R_1] + 2[R_2] + \dots + n[R_v]) + ([T_1] + 2[T_2] + \dots + n[T_v])}{n\{([R_0] + [R_1] + \dots + [R_v]) + ([T_0] + [T_1] + \dots + [T_v])\}}. \quad [39]$$

Si se define

$$\alpha = \frac{[L]}{k_R}, \quad [40]$$

donde  $\alpha$  no refiere a ninguna de las subunidades de la hemoglobina, sino a la concentración normalizada de ligando, puede determinarse también la tasa o razón de las afinidades intrínsecas relativas de los estados R y T ( $c$ ),

$$c = \frac{k_R}{k_T}. \quad [41]$$

Utilizando la ecuación [38] para sustituir  $[R_{v-1}]$  por  $[R_v]$ ,  $[R_{v-2}]$  por  $[R_{v-1}]$ , etc., los términos contenidos en el primer paréntesis del numerador de la ecuación [39] se reducen a

$$[R_0] \left\{ v\alpha + \frac{2v(v-1)\alpha^2}{2} + \dots + \frac{vv!\alpha^v}{v!} \right\} = [R_0] \alpha v \left\{ 1 + \frac{2(v-1)\alpha}{2} + \dots + \frac{v(v-1)!\alpha^{v-1}}{v(v-1)!} \right\} \quad [42]$$

$$= [R_0] \alpha v (1 + \alpha)^{v-1}$$

Utilizando las ecuaciones [37] y [41], se obtiene la ecuación para la saturación fraccional como función de la concentración de ligando libre.

$$Y = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{v-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{v-1}}{(1 + \alpha)^v + L(1 + c\alpha)^v} \quad [43]$$

De esta forma, el modelo plantea que en ausencia de sustrato, prácticamente todas las moléculas de la enzima se encontrarán en el estado T (fig. 11). La adición del sustrato cambia el equilibrio conformacional a favor de la forma R, puesto que el sustrato se une sólo o principalmente a la forma R. Cuando el sustrato se une al sitio activo en una subunidad en la conformación R, esto implica, según el postulado básico del modelo, que el resto de las subunidades deben estar también en el mismo estado conformacional. En otras palabras, las transición de T a R, o viceversa, esta coordinada. De aquí que la proporción de moléculas de proteína en la forma R aumenta progresivamente cada vez que se añade mas sustrato, y por ello, la unión del sustrato es cooperativa. La teoría plantea que en la saturación, todas las moléculas de proteína se encuentran en la forma R.

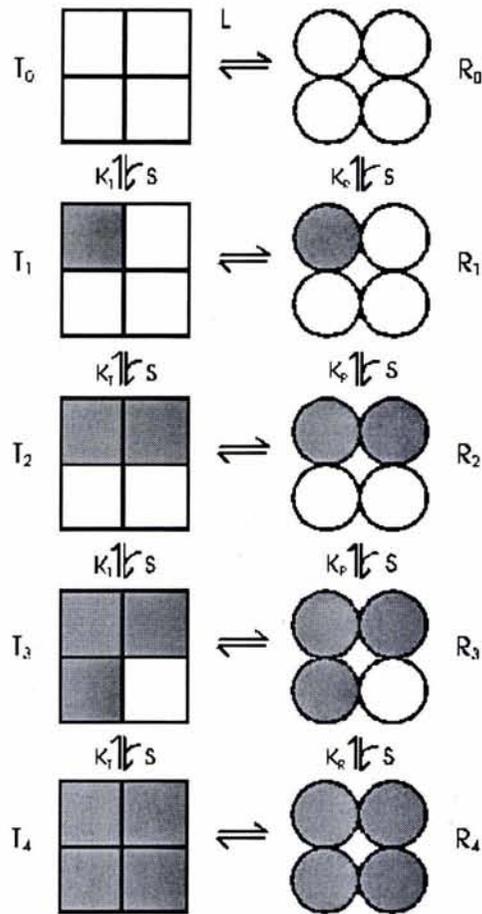


Figura 11. Especies y reacciones para una molécula tetramérica en el modelo de simetría. Los cuadrados representan al estado T y los círculos al R.

Las interacciones heterotrópicas también son fácilmente explicadas por este modelo, asumiendo que cada subunidad (o protómero) tiene sitios activos específicos e independientes para tres tipos de ligandos: el sustrato ( $F$ ); un activador ( $A$ ), que se une solamente al estado R; y un inhibidor ( $I$ ), que se une únicamente al estado T. Los efectos de los activadores e inhibidores alostéricos, pueden ser fácilmente explicados por este modelo concertado. Un inhibidor alostérico se une preferentemente a la forma T, mientras que un activador alostérico se une con preferencia a la forma R. En consecuencia, un inhibidor alostérico cambia el equilibrio conformacional  $R \rightleftharpoons T$  hacia T, mientras que un activador alostérico lo cambia hacia R. Estos efectos pueden expresarse de forma cuantitativa por un cambio en la constante alostérica de equilibrio  $L$ . Un

inhibidor alostérico aumenta  $L$ , mientras que un activador alostérico la disminuye.

Si consideramos que el ligando se une solamente al estado R, ( $c=0$ ), lo anterior se resume en la ecuación general del modelo MWC, que describe tanto interacciones homotrópicas como heterotrópicas:

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{v-1}}{(1+\alpha)^v + \frac{L(1+\beta)^v}{(1+\gamma)^v}}, \quad [44]$$

Donde  $\alpha = [L]/k_R$  como anteriormente; y, análogamente,  $\beta = [I]/k_I$ , mientras que  $\gamma = [A]/k_A$ .

Aun cuando este es un modelo sencillo, en un modelo de simetría más realista y algebraicamente mucho más complicado, se considera que todos los ligandos pueden unirse a ambas conformaciones del oligómero. En estos modelos, tanto los efectos homotrópicos como los heterotrópicos son explicados solamente bajo el requerimiento de la conservación de la simetría molecular, más que sobre la existencia de interacciones directas entre los ligandos.

## EL MODELO SECUENCIAL

Aun cuando el modelo de simetría ajusta perfectamente bien las curvas de fijación del  $O_2$  a la Hb y la saturación de muchas otras enzimas, y provee de un marco teórico para su explicación, existen algunas objeciones válidas. Quizás la primera y más importante es la de que la simetría de una proteína multimérica deba preservarse invariablemente en todas las proteínas y la imposibilidad de tener conformaciones híbridas del tipo  $R_n-2T_2$ . Adicionalmente, el modelo de simetría solo permite interacciones homotrópicas positivas, sin embargo, no es capaz de explicar las interacciones homotrópicas negativas.

Otro modelo clásico para explicar el mecanismo de las proteínas alostéricas es el modelo secuencial, que fue desarrollado por Koshland,

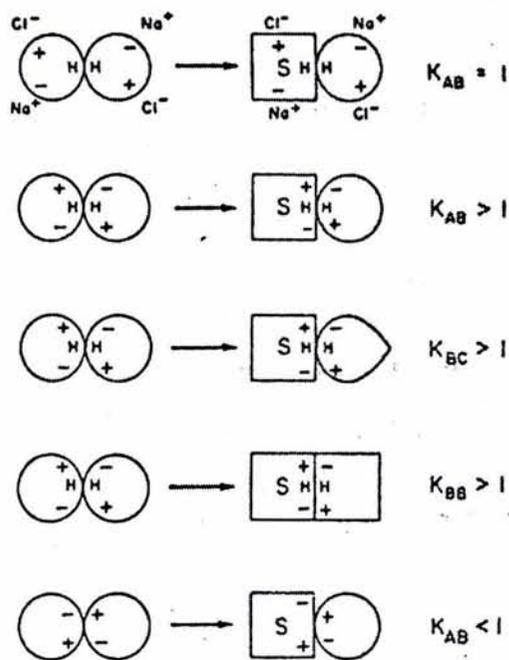


Figura 12. Formas alternativas de cambios conformacionales inducidos en las subunidades como resultado de la unión del ligando. S representa al ligando, y H las interacciones hidrofóbicas que mantienen unidas a las subunidades, y que no son alteradas por los cambios conformacionales. + y -, representan interacciones electrostáticas o puentes de hidrogeno. En el primer ejemplo, de arriba hacia abajo, los cambios conformacionales no provocan cambios netos en las interacciones entre las subunidades. En este caso, las cargas electrostáticas están demasiado distantes entre sí, por lo que no contribuyen a la estabilización de la estructura cuaternaria. Las cargas distantes pueden ser neutralizadas por elementos del solvente.  $K_{AB}=1$  porque no hay cambios netos en la interacción entre las subunidades. En la segunda línea, las cargas + y - se encuentran a una distancia tal que el cambio en una subunidad por la unión del sustrato estabiliza la estructura, sin que la subunidad libre sufra ningún cambio conformacional. En el tercer caso hay también una estabilización neta debido al efecto de las cargas electrostáticas adyacentes, pero en este caso, la subunidad libre si sufre cambio en su estructura. En el cuarto caso, el cambio en la subunidad vecina es esencialmente idéntico que el inducido por el ligando en la subunidad unida a este, debido principalmente a la fuerte interacción de las cargas adyacentes. Finalmente, se muestra un ejemplo en el que la interacción entre las subunidades disminuye, debido a que la unión del ligando induce cambios conformacionales tales que aumentan la distancia entre los grupos cargados disminuyendo la fuerza y estabilidad de dichas interacciones.

Nemerthy y Filmer en 1966 (Koshland, et al.). Este modelo se basa en la hipótesis del ajuste inducido, que postula una interacción flexible entre el ligando y la proteína. En este esquema, la unión del ligando induce cambios conformacionales locales en una subunidad de la proteína, los cuales afectan la estabilidad y la estructura de las subunidades vecinas.

Cuando un ligando induce una distorsión conformacional en una enzima multimérica, la estabilidad de las interacciones entre subunidades vecinas puede aumentar, disminuir o permanecer igual (fig. 12). De esta forma, la unión de una segunda molécula de ligando, no solo depende de los parámetros esperados para una proteína monomérica, sino también de los cambios en las interacciones entre las subunidades que componen al receptor. El modelo secuencial plantea estos efectos en términos de parámetros moleculares para explicar la cooperatividad.

Se considera la concentración total de cada especie molecular presente con respecto a la concentración de oligómero libre, que en este caso, para facilitar los cálculos, ejemplificaremos con un dímero, al cual denominaremos  $A_2$ . La constante de equilibrio para la reacción:



estaría dada por el producto de la constante de equilibrio para el cambio estructural (de la conformación  $A$  a la  $B$ ),  $K_{tAB}$ , multiplicada por la razón de la constante de afinidad en la configuración  $B$ , versus aquella en la configuración original ( $A$ ),  $K_{AB}/K_{AA}$ . Adicionalmente, debe incluirse un factor estadístico que tome en cuenta el número de combinaciones o posibles formas del complejo  $RF$ , dados  $i$  sitios unidos del total ( $v$ ),  $\left( \binom{v}{i} = \frac{v!}{i!(v-i)!} \right)$ .

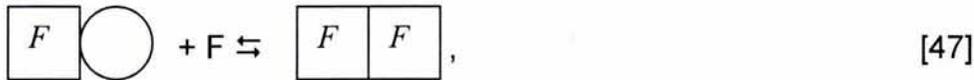
En este caso, por tratarse de un dímero, las posibles conformaciones moleculares tras la unión del primer ligando son  $B-A$  y  $A-B$ , mientras que existe una sola forma de tener  $A_2$ .

De esta manera, la constante de equilibrio para la reacción en la ecuación [45], queda definida por:

$$K = \frac{2K_{iAB}K_{AB}K_{FB}(F)}{K_{AA}}, \quad [46]$$

donde el paréntesis denota la concentración de ligando libre.

Si se repite el proceso para la unión de la segunda molécula de ligando,



la constante de equilibrio que se deriva es:

$$K = \frac{K_{iAB}K_{BB}K_{FB}(F)}{2K_{AB}}. \quad [48]$$

La función de saturación fraccional puede entonces calcularse como

$$Y = \frac{2K_{iAB}K_{AB}K_{FB}(F) + 2K_{iAB}^2K_{BB}K_{FB}^2(F)^2}{1 + 2K_{iAB}K_{AB}K_{FB}(F) + K_{iAB}^2K_{BB}K_{FB}^2(F)^2}. \quad [49]$$

Comparando la ecuación [48] con la [47], se observa que (después de corregir por el correspondiente factor estadístico), la constante de afinidad para la unión de la segunda molécula de ligando, sería igual a la constante de afinidad de la primera solamente si los términos que designan las interacciones entre las subunidades son idénticos para ambos casos. Sin embargo, si  $K_{BB}/K_{AB}$  es mayor que  $K_{AB}/K_{AA}$ , la unión de la segunda molécula de ligando se facilitará debido a un efecto cooperativo positivo, mientras que si  $K_{BB}/K_{AB}$  es menor que  $K_{AB}/K_{AA}$ , las

interacciones generadas entre las subunidades por la unión del primer ligando habrán generado un efecto cooperativo negativo.

Cálculos similares pueden obtenerse para otras especies moleculares diméricas, así como para oligómeros multivalentes con conformaciones diversas. En la tabla 1 se ilustran dos aspectos fundamentales del modelo secuencial. En primer lugar, se trata de una aproximación general aplicable a casos en los que diversas conformaciones están presentes. En segundo término, el modelo no requiere de suposiciones *a priori* sobre las magnitudes o el grado de interacción entre las subunidades.

Si se define como estado de referencia a la proteína libre, y la interacción entre los protómeros,  $K_{AA}=1$ , en el estado  $A$ , entonces, la cooperatividad homotrópica positiva se explica como una estabilización neta entre dos subunidades adyacentes en la conformación  $B$  con respecto a lo observado entre dos conformeros  $A$  o  $AB$  adyacentes ( $K_{AA}=K_{AB}=1$ ,  $K_{BB}>1$ ), lo que implica que la unión de la segunda molécula de ligando ocurre con mayor afinidad que la primera. Por el contrario, si  $K_{BB}<1$ , y  $K_{AA}=K_{AB}=1$ , entonces se habla de efectos homotrópicos negativos.

Cuando no existe ningún cambio en la interacción de las subunidades ( $K_{AA}=K_{AB}=K_{BB}=1$ ), lo que se obtiene es una curva de saturación hiperbólica característica de sitios activos independientes.

Como se mencionó anteriormente, este modelo puede extenderse a trímeros, tetrámeros y otros oligómeros con diferentes arreglos geométricos y para casos en los que participa más de un ligando (activadores, inhibidores, dos substratos) (Koshland, et al., 1966). La fuerza de las interacciones entre los sitios activos depende del grado de acoplamiento mecánico entre las subunidades de la proteína. En el límite de este acoplamiento, los cambios conformacionales de las subunidades pueden ser concertados, de tal manera que el oligómero puede mantener su simetría, tal como propone el modelo de simetría. Sin embargo, con un grado menor de acoplamiento, el cambio conformacional de la proteína completa ocurriría de manera secuencial y como función de la cantidad de ligando unido. En esencia, el modelo secuencial plantea que la afinidad depende

de manera directa del número de moléculas de ligando unidas, mientras que en el modelo de simetría, la afinidad depende solo de la estructura cuaternaria de la proteína.

Ahora bien, debido a que el grado de acoplamiento entre las subunidades de un oligómero depende del arreglo de las mismas, esto es, de la simetría molecular, en el modelo secuencial, la función de saturación tiene una forma algebraica diferente dependiendo de la simetría de cada oligómero, lo que define las posibles interacciones entre pares de subunidades vecinas.

En el caso de la hemoglobina, debe considerarse un tetrámero tetraédrico en el que cada subunidad interacciona con al menos dos de las tres subunidades restantes, y en la que cada subunidad puede existir en dos conformaciones diferentes (fig.13).

Debido a que la ecuación de Adair (ec. [34]), depende también del número de subunidades en la proteína, el modelo secuencial se ha considerado como una extensión de este, al proveerlo de un mecanismo físico para la racionalización de los valores de las constantes de asociación microscópicas  $k_i$ .

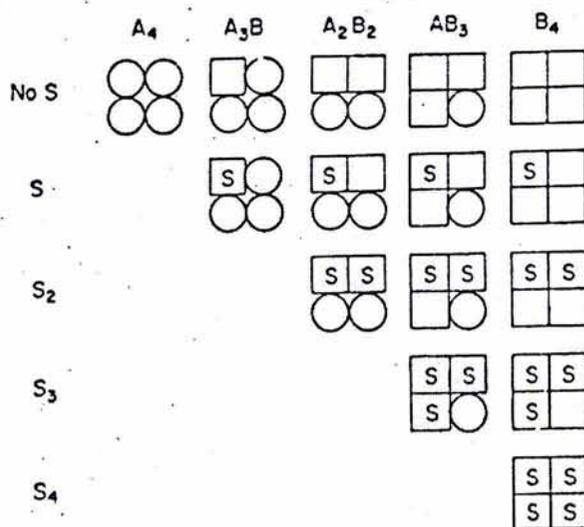


Figura 13. Posibles especies moleculares para un modelo general que involucra cuatro subunidades, dos posibles estados conformacionales para cada subunidad, y en el que el ligando solo puede unirse a uno de los dos estados conformacionales. Las columnas indican las especies con un número idéntico de subunidades en la conformación B, y los renglones agrupan a las especies con el mismo número de ligandos unidos.

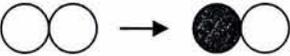
Cambio estequiométrico	Especie formada	razón de la concentración de la nueva especie con respecto a ( $A_2$ )
	$A_2F$	$2K_{FA}(F)$
	$AB$	$2K_{IAB}K_{AB}$
	$ABF$	$2K_{IAB}K_{AB}K_{FB}(F)$
	$BC$	$2K_{IAB}K_{IAC}K_{BC}$
	$BCF$	$2K_{IAB}K_{IAC}K_{BC}K_{FC}(F)$
	$CBF$	$2K_{IAB}K_{IAC}K_{BC}K_{FB}(F)$
	$B_2F$	$2K_{IAB}^2K_{BB}K_F(F)$
	$B_2F_2$	$K_{IAB}^2K_{BB}K_{FB}^2(F)^2$

Tabla 1. Posibles especies moleculares para un dímero que sufre cambios conformacionales inducidos por la unión de un ligando. La razón de la concentración de cada especie molecular con respecto a ( $A_2$ ) se calcula al multiplicar un factor estadístico determinado por las posibles especies moleculares para el dímero en cada caso (2), el término energético que refiere al cambio conformacional, ( $K_{IAB}$ , por ejemplo), y el cambio en la interacción entre las subunidades (por ejemplo  $K_{BC}$ .  $K_{AA}=1$  es usado como estado de referencia). La afinidad del ligando por una conformación específica queda indicada en cada caso como  $K_{FA}$ ,  $K_{FB}$ , y  $K_{FC}$ , especificando además la concentración de ligando unido.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tradicionalmente, la distribución de afinidades de los sitios activos de poblaciones heterogéneas de receptores ha sido determinada a partir de las isothermas de fijación clásicas. Estas distribuciones son normalmente gaussianas bajo el logaritmo de la afinidad, cuando se trata de poblaciones de receptores con sitios idénticos e independientes, y se asocian a la distribución de afinidades de los sitios activos, por lo que se consideran tema de estudio de la mecánica estadística.

En este trabajo hemos derivado, también a partir de las isothermas de fijación, las distribuciones probabilísticas de las constantes termodinámicas. La importancia de estas distribuciones radica en que pueden asociarse directamente a cantidades medibles experimentalmente, y representan distribuciones de afinidad por paso de fijación. Además, el promedio de las distribuciones termodinámicas resulta ser la distribución de mecánica estadística de los sitios para sistemas heterogéneos de receptores independientemente de si hay o no cooperatividad (José & José, 1998).

Las isothermas que representan la unión del ligando por cada paso de fijación, ( 4 en el caso de la hemoglobina), pueden obtenerse a partir de sus respectivas distribuciones termodinámicas. Estas a su vez, pueden derivarse de la isoterma de fijación obtenida experimentalmente.

Dado que las distribuciones termodinámicas están directamente asociadas a cantidades medibles experimentalmente, será posible asociar a cada isoterma su correspondiente distribución termodinámica, y por consiguiente las transiciones energéticas que se relacionan directamente con los eventos funcionales medidos durante el proceso de fijación de  $O_2$  y  $CO$  a la hemoglobina. Al relacionar esta información con los cambios en la energía libre durante el proceso de saturación, es posible obtener nueva información sobre la naturaleza de las especies intermediarias formadas durante la unión cooperativa de estos ligandos a la hemoglobina.

## TEORIA

Las propiedades fisicoquímicas de un sistema se definen termodinámicamente mediante un conjunto de variables microscópicas que pueden ser medidas o cuantificadas experimentalmente (Fermi, 1936; Schrödinger, 1946). Si una macromolécula es considerada como un sistema, entonces sus variables observables reflejan las propiedades del sistema, y la forma en la cual es afectada por fuerzas físicas y químicas. Una macromolécula en presencia de múltiples ligandos puede verse como un sistema existiendo en un número dado de diferentes estados energéticos,  $E_1, E_2, \dots, E_v$ .

Cada estado de energía puede estar asociado a un estado conformacional de la macromolécula, por ejemplo, un arreglo específico de su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. Adicionalmente, cada estado de energía,  $E_j$ , queda especificado por el número de ligandos unidos a la macromolécula, o bien por una configuración o estado de ligación particular. Diferentes estados energéticos o mejor dicho configuraciones moleculares pueden agruparse en el mismo nivel de energía, de acuerdo con su nivel o grado de degeneración.

De esta forma, si  $V$  es el volumen de la macromolécula, cualquier estado de energía puede describirse como  $E_j(N, V)$ , donde  $N$  representa el número de moléculas de ligando unidas al receptor o macromolécula, y el espectro de valores de energía  $E_1, E_2, \dots, E_v$ , denota los posibles estados de energía accesibles al sistema, con valores especificados de  $N$  y  $V$ .

Si el  $\Delta G$  estándar entre las formas libre y unida de la macromolécula esta dada por:

$$\Delta G = G_1 - G_0 = -RT \ln K, \quad [50]$$

donde  $K$  es la constante de equilibrio de la reacción, entonces,

$$K = \exp\left(\frac{G_0 - G_1}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right).$$

De esta manera, suponemos que el estado de ligación especifica la energía libre de la macromolécula.

Para una molécula con un solo sitio activo,  $G_0$  define al estado libre, y  $G_1$  para el estado cuyo único sitio se encuentra unido al ligando. El grado de degeneración se obtiene a partir de las diferentes disposiciones en las cuales el ligando puede unirse a los sitios activos sin alterar su nivel de energía libre para cada uno de los posibles estados de ligación. En este caso particular solo hay una configuración molecular posible para cada estado energético, (libre o unido), por lo que la constante de equilibrio es suficiente para caracterizar la reacción. Esta es una consecuencia de la ley de acción de masas (Prigogine y Defay, 1954) a través de la cual, el ligando se une al sitio activo del receptor de manera específica y saturable, de una manera que puede predecirse a partir del conocimiento de la actividad o potencial químico del ligando. La forma libre de la macromolécula puede tomarse como referencia y sin pérdida de generalidad, y suponer que  $G_0=0$ , por lo que la función de partición asumiría en este caso la forma

$$Z = 1 + KL \quad [51]$$

El número promedio de sitios unidos por molécula,  $r$ , se obtienen a partir de derivar la función de partición con respecto a la concentración de ligando libre

$$r = \frac{d \ln Z}{d \ln L} = \frac{KL}{1 + KL} \quad [52]$$

## **DISTRIBUCIONES DE AFINIDAD ESTEQUIOMETRICAS EN SISTEMAS HETEROGÉNEOS DE RECEPTORES MULTIVALENTES**

Asumamos ahora un sistema heterogéneo, que consiste de subpoblaciones de receptores con diferentes afinidades, cuyos sitios activos no presentan interacciones.

Al igual que en un sistema homogéneo, en este caso, las constantes estequiométricas,  $K_i$ , de cada subpoblación están relacionadas con la constante

de afinidad intrínseca de los sitios,  $k$ , mediante la expresión (Klotz, 1946), (Ec. [24]),

$$K_i = \left( \frac{v-i+1}{i} \right) k \equiv d_i k. \quad [53]$$

Si  $k$  es una variable aleatoria, con una función de distribución de probabilidad  $N(k)$ , entonces, la constante de equilibrio  $K_i$ , que gobierna la unión del  $i$ ésimo ligando monovalente al receptor ( $i = 1, \dots, v$ ), tiene una función de distribución de probabilidad  $T_i$  dada por:

$$T_i(K_i) = \int N(k) \delta(K_i - d_i k) dk, \quad [54]$$

Donde  $\delta(\cdot)$  es la función delta de Dirac. Evaluando esta integral, se tiene que:

$$T_i(K_i) = N(K_i/d_i)/d_i. \quad [55]$$

Aquí, la SAD se obtiene simplemente al reescalar la forma funcional de la sad. Es importante notar, sin embargo, que el reescalamiento de los valores de  $K_i$  se obtiene a través de los factores  $d_i$ . Para obtener  $N(k)$  en términos de todas las  $T_i(K_i)$ 's nótese que, por ejemplo, si  $v=4$  entonces,  $d_1 T_1(d_1 k) = N(k)$ ,  $d_2 T_2(d_2 k) = N(k)$ ,  $d_3 T_3(d_3 k) = N(k)$  y  $d_4 T_4(d_4 k) = N(k)$ , por lo tanto,  $N(k) = 1/4 [d_1 T_1(d_1 k) + d_2 T_2(d_2 k) + d_3 T_3(d_3 k) + d_4 T_4(d_4 k)]$ .

De esta forma, para cualquier valor de  $v$  se tiene que

$$N(k) = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^v d_i T_i(K_i), \quad [56]$$

donde  $K_i = d_i k$ . Esta ecuación establece que, en el caso de sistemas multivalentes y heterogéneos de receptores,  $N(k)$  puede expresarse como el promedio ponderado sobre todas las  $T_i(K_i)$ 's. nótese que la ecuación [56] es válida cuando la función de distribución de probabilidad es continua. Cuando

esta última es discreta, la función delta de Dirac se reemplaza por la delta de Kronecker.

Si  $K_i = d_i' k$ , con  $i=1,2,\dots,v$ , y siendo  $d_i'$  una constante determinística, posiblemente diferente de  $d_i$  (dada en la ecuación [53]), que toma en consideración las interacciones entre los diferentes sitios activos, entonces, las ecuaciones [55] y [56] siguen siendo válidas después de haber reemplazado  $d_i$  por  $d_i'$ . Mas aun,  $\ln(K_i) = \ln(d_i') + \ln(k)$ , y una vez demostrado que la varianza de  $\ln k$  existe, se tiene entonces que (José & José, 1998)

$$\text{var}(\ln(k)) = \text{var}(\ln(K_1)) = \text{var}(\ln(K_2)) = \dots = \text{var}(\ln(K_v)). \quad [57]$$

La ecuación [57] determina que bajo la transformada logarítmica de la afinidad, la varianza, es invariante en la distribución de afinidades.

## DISTRIBUCIONES ESTEQUIOMETRICAS DE AFINIDAD DE LA HEMOGLOBINA

Asumamos ahora que  $N(k)$  es una distribución continua, y que puede ser evaluada utilizando un método de diferencias finitas (Hunston, 1975; Ninomiya & Ferry, 1959; Ferry, 1970), que da como resultado la siguiente aproximación:

$$n(k) = \left. \frac{r(aF) - r(F/a)}{2 \log_{10} a} - \frac{a}{(a-1)^2} \cdot \frac{[r(a^2 F) - r(F/a^2)] - 2[r(aF) - r(F/a)]}{2 \log_{10} a} \right|_{F=1/k}, \quad [58]$$

donde  $a$  es una constante arbitraria mayor que 1. En la práctica se ha establecido  $a = 1.585$  (1,5,10);  $r$  y  $F$  quedan definidos como en la ecuación [3]. Tanto  $N(k)$  como  $n(k)$  son equivalentes, y están relacionadas mediante el cambio de variable  $kd(\log_{10} k) = 0.4343 dk$ . Este método ha sido elegido porque permite trabajar con distribuciones de formas arbitrarias de la *sad* (Scatchard, 1949). Las distribuciones de afinidad microscópicas,  $T_i(K_i)$ 's pueden entonces construirse utilizando la ecuación [56].

Para formular las SADs para el tetrámero de hemoglobina, debemos considerar las relaciones generales entre las constantes de afinidad intrínsecas o de sitio ( $k_i$ s) y las estequiométricas ( $K_i$ s). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina se ensamblan en un tetrámero de tal manera que forman 2 contactos  $\alpha\beta$  que no son estructuralmente equivalentes, generando 10 posibles estados diferentes de ligación (figura 14). Estos estados definen la función de partición independiente del modelo, representando la unión del ligando a los cuatro grupos hemo de la hemoglobina de la siguiente manera (Di Cera, 1995; Perrella & Di Cera, 1999):

$$Z = 1 + 2(k_\alpha + k_\beta)F + [c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 2(c_{\alpha\beta} + c'_{\alpha\beta})k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2]F^2 + 2(c_{\alpha\alpha\beta}k_\alpha + c_{\alpha\beta\beta}k_\beta)k_\alpha k_\beta F^3 + c_{\alpha\alpha\beta\beta}k_\alpha^2 k_\beta^2 F^4, \quad [59]$$

donde otra vez,  $F$  es la concentración de ligando libre o, o presión parcial, en el caso de ligandos gaseosos,  $k_\alpha$  y  $k_\beta$  son las constantes de afinidad de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  cuando el resto de las mismas están libres de ligando,  $c_{\alpha\alpha}$ ,  $c_{\alpha\beta}$ ,  $c'_{\alpha\beta}$ , y  $c_{\beta\beta}$  son las constantes de interacción de segundo orden entre los cuatro posibles pares de subunidades,  $c_{\alpha\alpha\beta}$ , y  $c_{\alpha\beta\beta}$  son las constantes de interacción de tercer orden que involucran los dos posibles tripletes, y finalmente,  $c_{\alpha\alpha\beta\beta}$  es la constante de interacción de cuarto orden, que involucra a todas las cadenas. Los valores de  $c$  reflejan la presencia de interacciones positivas ( $c > 1$ ), negativas ( $c < 1$ ) o, no interacciones ( $c = 1$ ). Puesto que hay diez posibles configuraciones en la ecuación [59], una de las cuales se utiliza solo como referencia, entonces, debiera de haber 9 reacciones independientes entre los posibles intermediarios y por ende, un número equivalente de constantes de equilibrio independientes.

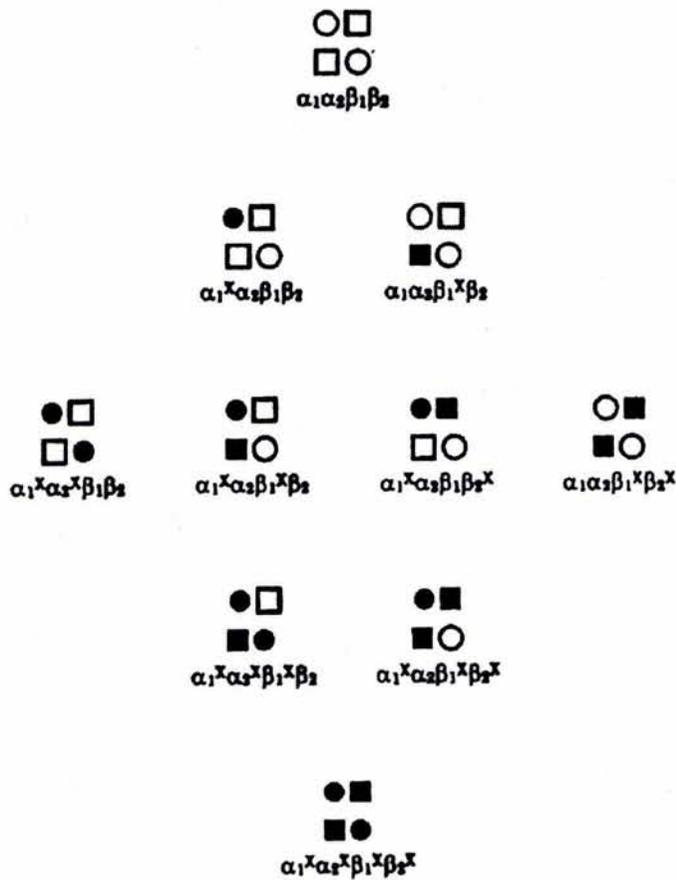


Figura 14. Estados moleculares posibles para la interacción de la hemoglobina con O<sub>2</sub> o CO (X). La simetría del tetrámero  $\alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2$  reduce el número de posibles estados de ligación de 16 a 10. Bajo cada especie molecular se especifica la cadena unida al ligando.

La ecuación [59] puede entonces usarse para evaluar r como:

$$r = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln F} ; \quad [60]$$

r puede también ser evaluado directamente de los datos experimentales de fijación de ligandos, o utilizar el formalismo de Adair (Adair, 1925), que toma en cuenta los cuatro posibles estados de ligación sin discriminar entre las diferentes cadenas de la hemoglobina. En un proceso secuencial, solo una fracción de todas las posibles especies microscópicas para cada evento de fijación, pueden formarse. La descripción sitio-específica del proceso de unión del ligando a los receptores de los cuatro hemos de la hemoglobina descrita en la ecuación [59], puede relacionarse con las cuatro constantes estequiométricas de Adair de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
K1 &= \frac{k_\alpha + k_\beta}{2} \\
K2 &= \frac{1}{3} \left( \frac{c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 2(c_{\alpha\beta} + c'_{\alpha\beta})k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2}{k_\alpha + k_\beta} \right) \\
K3 &= \frac{3(c_{\alpha\alpha}k_\alpha + c_{\alpha\beta\beta})k_\alpha k_\beta}{c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 2(c_{\alpha\beta} + c'_{\alpha\beta})k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2} \\
K4 &= \frac{2c_{\alpha\alpha\beta\beta}k_\alpha k_\beta}{c_{\alpha\alpha\beta}k_\alpha + c_{\alpha\beta\beta}k_\beta}
\end{aligned} \tag{61}$$

La distribución de todos los estados intermedios de ligación puede también analizarse en términos de los modelos clásicos MWC y KNF (Monod et al, 1965; Koshland et al., 1966), puesto que todos los modelos propuestos para describir la cooperatividad en la hemoglobina pueden derivarse como casos especiales de la ecuación [59].

La función de partición para el modelo MWC es

$$Z = \frac{L(1 + k_{\alpha T}F)^2(1 + k_{\beta T}F)^2 + (1 + k_{\alpha R}F)^2(1 + k_{\beta R}F)^2}{L + 1}, \tag{62}$$

donde  $L$  es, como se describió anteriormente, la constante alosterica que refleja la concentración de moléculas en el estado T con respecto a aquella en el estado R en ausencia de ligando;  $k_{\alpha T}$  y  $k_{\alpha R}$  son las constantes de unión a las subunidades  $\alpha$  en los estados T y R respectivamente, y  $k_{\beta T}$  y  $k_{\beta R}$  son las constantes análogas para las cadenas  $\beta$ .

Por su parte, la función de partición para el modelo KNF es

$$\begin{aligned}
Z &= 1 + 2(k_\alpha + k_\beta)F + (c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 4c_{\alpha\beta}k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2)F^2 + 2(c_{\alpha\alpha}k_\alpha + c_{\beta\beta}k_\beta)c_{\alpha\beta}^2k_\alpha k_\beta F^3 + \\
&+ c_{\alpha\alpha}c_{\alpha\beta}^4c_{\beta\beta}k_\alpha^2k_\beta^2F^4
\end{aligned} \tag{63}$$

donde  $k$  representa la afinidad intrínseca para cada una de las cadenas, y los distintos valores de  $c$  representan las constantes de interacción entre pares de subunidades.

En estos términos, los resultados obtenidos para los dos modelos pueden ser comparados directamente ya que presentan el mismo número de parámetros independientes.

## RESULTADOS

En la figura 15a se muestra la isoterma de fijación calculada teóricamente para la reacción de un ligando monovalente con una población homogénea de receptores tetravalentes, en ausencia de interacciones los sitios activos. Las figuras 15b y 15c muestran las correspondientes  $n(k)$  y SADs. Para simular una molécula tetravalente que no presente interacciones entre los sitios activos, utilizamos el valor reportado para la constante estequiométrica de Adair  $K_1$ , reportada por Perrella y Di Cera (Perrella & Di Cera, 1999), para la reacción de la hemoglobina con CO. La ecuación [53] fue posteriormente utilizada para generar los restantes valores de  $K_i$ . La distribución  $n(k)$  (Fig. 15b) se deriva de la correspondiente isoterma (Fig. 15a) al estimar  $r$  a una serie de 4 diferentes valores de  $F$ , como se indica en la ecuación [58]. Las SADs fueron posteriormente calculadas utilizando la ecuación [56].

Nótese que en ausencia de interacciones entre los sitios,  $n(k)$  y las cuatro SADs son normales bajo el logaritmo de  $F$ . En la figura 15c, las distribuciones están graficadas con sus respectivas escalas de abscisas para ilustrar que  $n(k)$  es proporcional al promedio de  $T_1(K_1)$ ,  $T_2(K_2)$ ,  $T_3(K_3)$  y  $T_4(K_4)$ , como establece la ecuación [56]. Nótese que el rango de los valores de afinidad para  $T_1(K_1)$  es mayor que el rango de valores de afinidad para  $T_2(K_2)$ , y lo mismo pasa con  $T_3(K_3)$  y  $T_4(K_4)$ . Esto implica que la concentración molar de especies moleculares con uno, dos o mas ligandos unidos no es la misma a diferentes rangos de afinidad.

Debido a que la unión del CO a la hemoglobina es altamente cooperativa y presenta una afinidad aun mayor que la del O<sub>2</sub> (Di Cera, 1995; Perrella & Di Cera, 1999; Perrella et al, 1998), este representa un ligando ideal para poder discriminar experimentalmente las propiedades cooperativas sitio-especificas de la hemoglobina, las cuales son muy difíciles de estudiar utilizando al O<sub>2</sub> debido a la elevada velocidad de la cinética de su disociación (Olson et al., 1971).

Utilizando los valores de las cuatro constantes de Adair para la unión secuencial del CO a la hemoglobina reportadas por Perrella y Di Cera (Perrella &

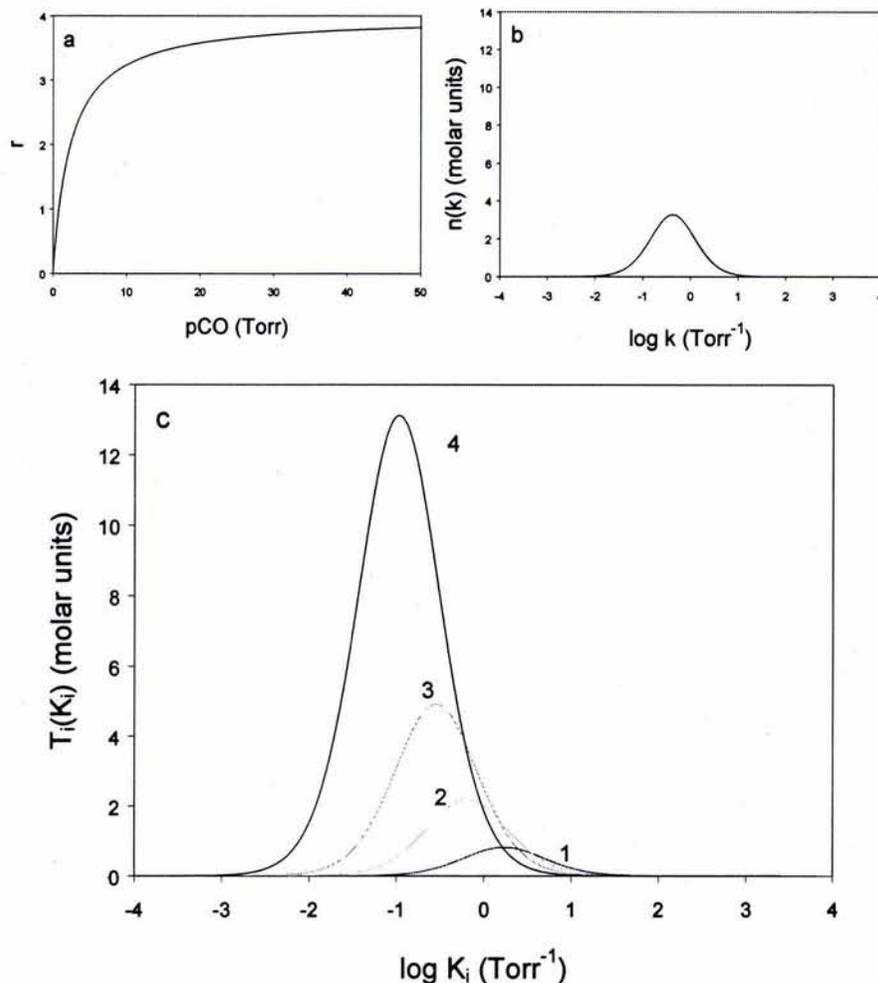


Figura 15. Isotherma de fijación, sad y SAD correspondientes a un receptor con cuatro sitios independientes que reacciona con un ligando monovalente. (a) Distribución de frecuencias acumuladas de la afinidad. (b) Distribución teórica de la afinidad de los sitios activos ( $n(k)$ ). (c) Distribuciones de afinidad termodinámicas ( $T_i(K_i)$ ), correspondientes a cada paso de fijación. ( $K_1=1.7$ ,  $K_2=28$ ,  $K_3=1.3 \times 10^2$ ,  $K_4=1 \times 10^3$ ).

Di Cera, 1999), se calculo la isoterma de fijación que se muestra en la figura 16a. Como se observa en la figura 16b, cuando se consideran las interacciones generadas entre los sitios activos por la unión del ligando, el patrón de la distribución que se obtiene es muy diferente. Nótese que en este caso, tanto las sad como las SADs son multimodales (Figs. 16b y 16c). Cada paso de fijación del ligando parece generar al menos 2 subpoblaciones claramente diferentes y bien definidas, las cuales que se caracterizan porque presentan distintas afinidades y frecuencias relativas. Una de estas subpoblaciones muestra alta

afinidad, pero presenta una frecuencia relativa baja, mientras que la otra, se caracteriza por presentar menor afinidad, pero mayor frecuencia. Una tercera subpoblación, que muestra la menor afinidad de todas, aparece truncada; sin embargo, el resto de la curva puede obtenerse cuando en la simulación, se utilizan valores de concentración de ligando libre, que exceden los valores utilizados experimentalmente. Esta tercera subpoblación tendría, al parecer, la misma frecuencia relativa de aquella que presenta alta afinidad, lo que generaría una distribución teórica trimodal y simétrica.

El análisis de la curva de unión del CO a la hemoglobina en términos del formalismo de Adair, involucra solamente 4 parámetros independientes, en contraste con los 9 de la descripción sitio-específica (Di Cera, 1995). De la definición de las constantes de Adair en la ecuación [61], se deduce que diferentes combinaciones de los 10 estados de ligación de la hemoglobina, pueden traducirse al mismo patrón de constantes secuenciales estequiométricas y, por lo tanto a las mismas SAD.

La figura 17a muestra las distribuciones de frecuencias acumuladas teóricas, las cuales representan isothermas de ligación por paso de fijación, que fueron reconstruidas utilizando las ecuaciones [59] y [60], y los parámetros sitio-específicos publicados por Perrella y Di Cera (Perrella & Di Cera, 1999), para la reacción de la hemoglobina con CO. La figura 17b muestra las correspondientes sad's. Es interesante notar que tanto las sad's como las SAD's parecen ser trimodales, excepto para el primer paso de fijación, el cual tiene una distribución unimodal y simétrica en el caso de la sad. Esto no es de sorprender, pues el comportamiento del primer paso de fijación, se parece mucho al observado en ausencia de interacciones. En ambos casos, se trata de receptores homogéneos con sitios activos independientes.

La curva de fijación del CO a la hemoglobina reconstruida a partir de los datos de Perrella y Di Cera (Perrella & Di Cera, 1999), pueden ajustarse muy bien utilizando los modelos MWC y KNF (Fig. 18a y 18d). En ambos casos, las

isotermas de fijación se obtuvieron por medio de la ecuación [60], y las correspondientes funciones de partición (ecs. [62] y [63]). Como se muestra en

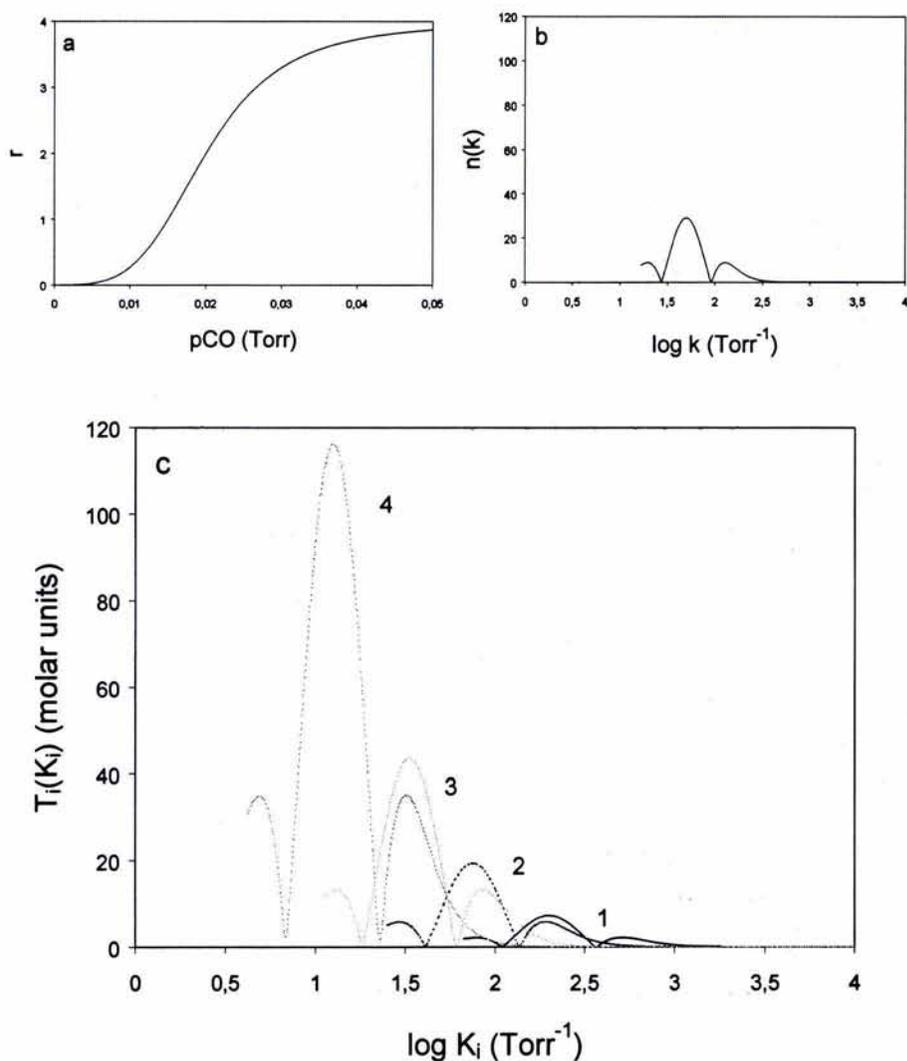


Figura 16. Isotherma de fijación, sad y SADs correspondientes a la reacción de la hemoglobina con CO. (a) Distribución de frecuencias acumuladas de la afinidad, que corresponde a la isoterma de fijación del ligando. (b) Distribución de afinidad de los sitios activos ( $n(k)$ ). (c) Distribuciones de afinidad estequiométrica ( $T_i(K_i)$ ), numeradas del 1 al 4 para indicar el correspondientes paso de fijación. Cada  $T_i(K_i)$  esta graficada versus el  $\log K_i$ .

las figuras 18b-c y 18e-f, las sad y las SAD obtenidas en cada caso son también multimodales y prácticamente indistinguibles entre si. Sin embargo, en el modelo

MWC, las subpoblaciones con afinidad alta e intermedia, parecen estar mejor definidas que en el modelo KNF.

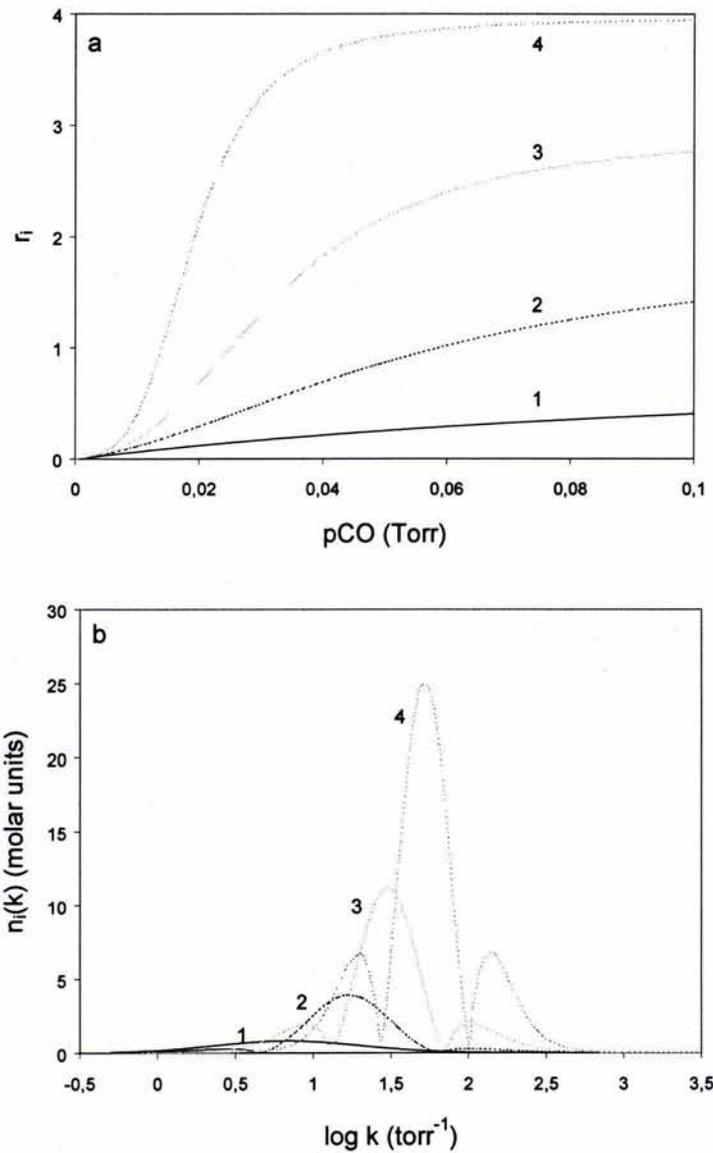


Figura 17. Isothermas teóricas y correspondientes sad's para los cuatro pasos de fijación del CO a la hemoglobina. (a) Distribuciones de frecuencias acumuladas de las afinidades por paso de fijación. (b)  $n_i(K_i)$  teóricas. ( $k_\alpha=1.1$ ,  $k_\beta=2.3$ ,  $c_{\alpha\alpha}=49$ ,  $c_{\alpha\beta}=c'_{\alpha\beta}=16$ ,  $c_{\beta\beta}=13$ ,  $c_{\alpha\alpha\beta}=2.4 \times 10^3$ ,  $c_{\alpha\beta\beta}=1.1 \times 10^3$ ,  $c_{\alpha\alpha\beta\beta}=1.1 \times 10^3$ ). En este caso se ha utilizado una sola escala para las abscisas.

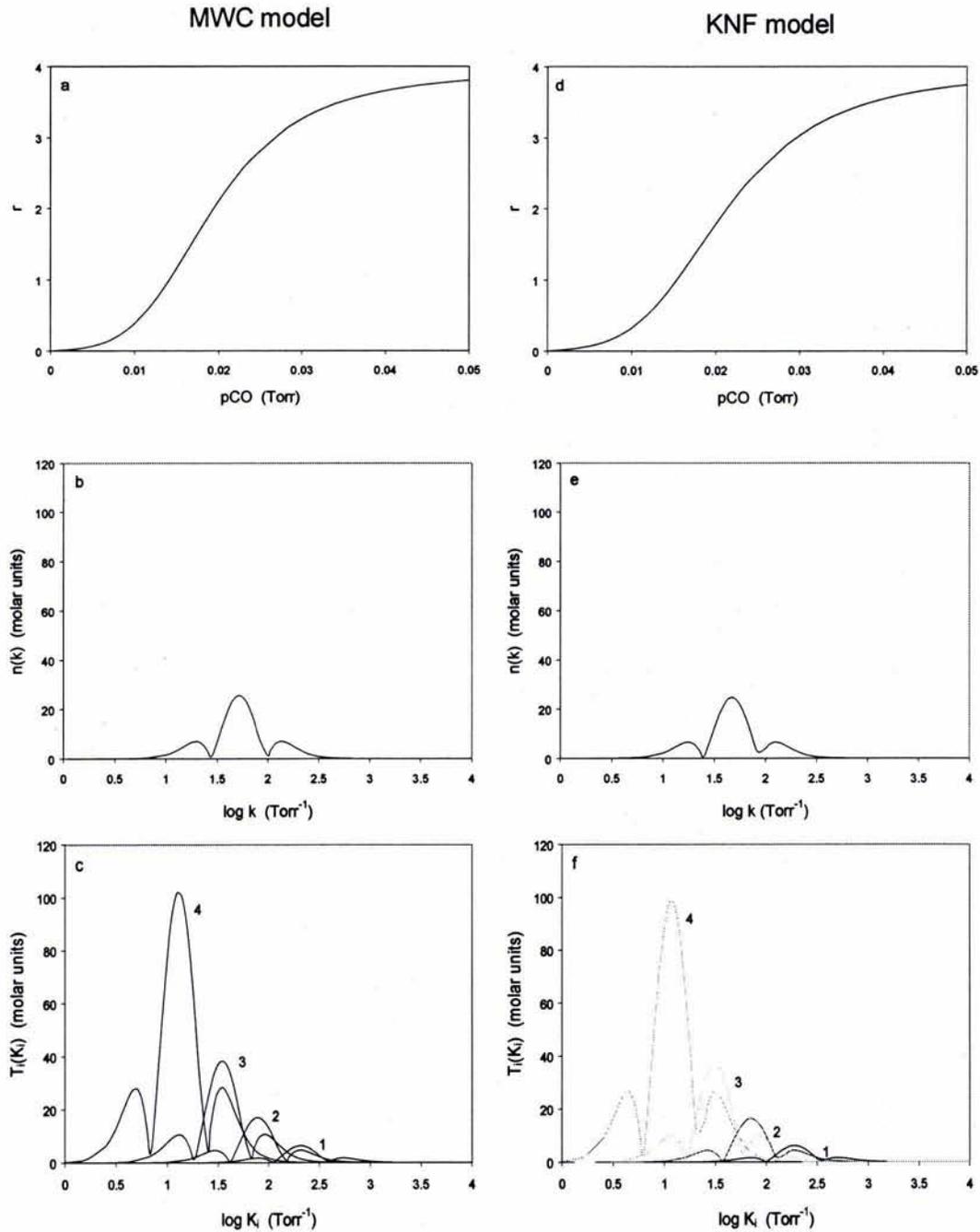


Figura 18. Ajuste de la Isoterma de fijación del CO a la hemoglobina con el modelo MWC (a), y correspondientes  $n(k)$  (b) y  $T_i(K_i)$  (c). Ajuste de los datos con el modelo KNF (d), y correspondientes  $n(k)$  (e) y  $T_i(K_i)$  (f).

Usando datos experimentales tomados de Boeri (Boeri, 1962), fuimos capaces de obtener la distribución de probabilidades de las afinidades para la reacción de unión de la hemoglobina con  $O_2$ , a partir de datos experimentales. La figura 19a muestra el ajuste de los datos experimentales, utilizando la solución de la ecuación logística

$$r = r_t + \frac{r_r - r_t}{1 + \gamma e^{-\sigma(pO_2/p50)}} \quad , \quad [64]$$

donde las mesetas inferior ( $r_t$ ), y superior ( $r_r$ ), establecen la mínima y la máxima saturación posibles respectivamente,  $pO_2$  es la presión parcial de  $O_2$ ,  $p50$  es la presión parcial de  $O_2$  al 50% de saturación, y  $\sigma$  y  $\gamma$ , determinan el rango y la pendiente de la región lineal de la curva  $r$  versus  $pO_2$ . En este caso  $n(k)$  y todas las  $T_i(K_i)$ 's muestran distribuciones similares a aquellas en las figuras 16 y 18. Solo dos de las modas están bien definidas, y una tercera moda puede observarse solo parcialmente. El resto de esta última parece detectarse solo a valores de concentración de ligando muy elevados, los cuales no se consideran fisiológicamente relevantes.

Este resultado parece indicar, que la cooperatividad positiva genera al menos dos subpoblaciones diferentes tan pronto como dos de los cuatro sitios estén ocupados (ver también figura 16b). Como se muestra en las figuras 16b y c,  $n(k)$  y las  $T_i(K_i)$ 's nos permiten analizar en términos del número de sitios unidos, el tipo de especies moleculares que están involucradas en la generación de las subpoblaciones observadas en  $n(k)$ . Las figuras 19b y 19c muestran que la primera moda de  $n(k)$  representa un estado molecular de alta afinidad, compuesto por especies moleculares que tienen esencialmente uno o dos sitios unidos. La segunda y más frecuente subpoblación en  $n(k)$  parece representar una mezcla de especies moleculares a la que contribuyen con diferentes frecuencias intermediarios con dos, tres y cuatro sitios ocupados, pero que no incluye moléculas con un solo sitio unido al ligando. La tercera moda, parecería incluir solamente la región de moléculas con tres y cuatro ligandos unidos, pero

como se ha señalado anteriormente, esta tercera subpoblación podría ser muy difícil de detectar experimentalmente.

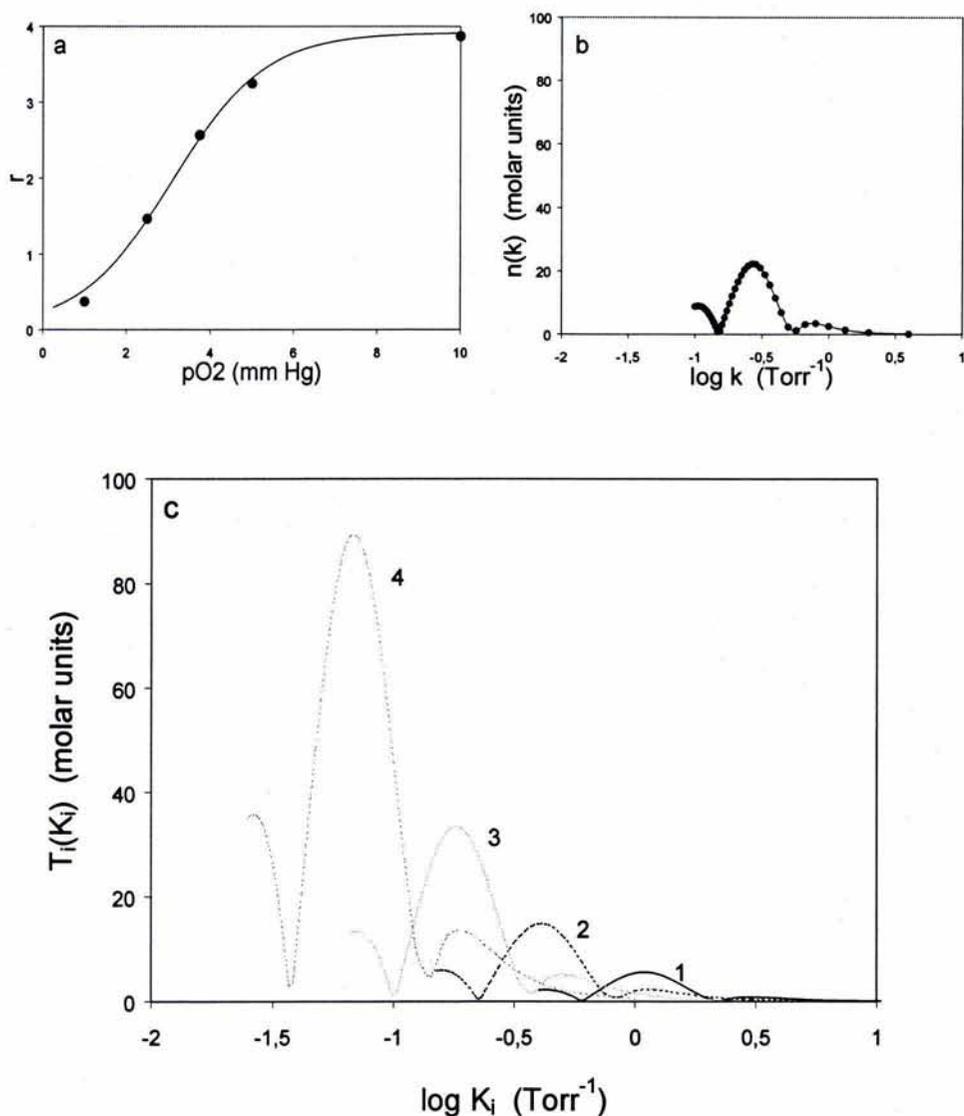


Figura 19. Curva de saturación de la hemoglobina como función de  $pO_2$  (a). Datos experimentales ( $\bullet$ ), ajuste no lineal (—). Correspondientes ( $n(k)$ ), (b), y  $T_i(K_i)$  (c).  $\sigma = 2.513$ ,  $\gamma = 16$ , y  $R^2 = 0.92$ .

La generación de subpoblaciones heterogéneas en términos de su afinidad por el  $O_2$  o  $CO$  podría estar relacionada directamente con el papel fisiológico de la hemoglobina, puesto que esta molécula es capaz de reaccionar de acuerdo a las condiciones del medio en el que se encuentra. Una de estas subpoblaciones

podría estar funcionando como una especie de estado antena, el cual une las primeras moléculas de ligando, induciendo el fenómeno cooperativo. Este estado antena aparecería bajo condiciones que promueven alta afinidad (ej. En los pulmones, donde la  $pO_2$  es lo suficientemente). La segunda subpoblación, que presenta una alta frecuencia podría encontrarse bajo una serie de condiciones que generarían valores intermedios de afinidad, conduciendo presumiblemente a un estado que una al ligando de manera estable, funcionando como un, que podría relacionarse con la función de transporte de  $O_2$  de la hemoglobina. Un tercer estado molecular podría encontrarse bajo condiciones que promueven la disociación del  $O_2$  de su transportador. Este estado transitorio muestra una muy baja afinidad de tal manera que actúa como un liberador del ligando gaseoso.

## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos obtenido las *sad* y *SADs* para la caracterización de la unión cooperativa de ligandos monovalentes gaseosos a la hemoglobina. Esta caracterización nos provee de una nueva forma de analizar el efecto de las interacciones entre los sitios activos, en términos de distribuciones de afinidad que son continuas y no gaussianas. El método de diferencias finitas que hemos utilizado para obtener  $n(k)$  es numéricamente simple y fácilmente aplicable a datos experimentales.

La multimodalidad observada tanto en las *sad* como en las *SADs* fue algo inesperado y podría estar relacionada con la generación de heterogeneidad durante el proceso de fijación de los ligandos, en el cual están involucradas interacciones positivas entre los diferentes sitios activos. Por mucho tiempo ha sido reconocido que las interacciones negativas son en si mismas una fuente de heterogeneidad que se genera durante el proceso de saturación (José & Larralde, 1982; José & José, 2001), pero la contribución explícita de la cooperatividad positiva a la forma de las *sad* y *SADs* no había sido considerada.

Las constantes termodinámicas contienen la información necesaria para analizar la estructura de los cambios generados por la unión del  $O_2$  y otros ligandos a la hemoglobina, puesto que estas pueden relacionarse directamente con el cambio en la energía libre molar ( $\Delta G_i = -RT \ln K_i$ ) de la reacción de un deoxitetramero con un número estequiométrico de moléculas de ligando, correspondientes al número de posibles grupos hemo unidos a este. Las  $T_i(K_i)$ 's representan distribuciones termodinámicas de afinidad por paso de fijación que pueden relacionarse con cantidades que son experimentalmente medibles, en contraste con las constantes afinidad de sitio, las cuales son variables microscópicas de mecánica estadística, que no pueden medirse directamente (Klotz & Hunston, 1975; 1979). En este trabajo se ha mostrado que en ausencia de interacciones entre los sitios, las *sad* y *SADs* son tanto unimodales como simétricas; pero cuando interacciones positivas están involucradas, las correspondientes distribuciones teóricas son todas multimodales. La

cooperatividad positiva, produciría en teoría distribuciones simétricas si las concentraciones de ligando se incrementan sistemáticamente y no modifican la varianza del  $\ln K_i$ 's. Sin embargo las distribuciones de afinidad obtenidas directamente a partir de los datos, no parecen ser simétricas (fig. 19).

En principio, las constantes estequiométricas pueden considerar las interacciones que se generan entre los sitios y permiten caracterizar un sistema heterogéneo de ligando y receptores conforme ocurre el proceso de saturación. El tratamiento termodinámico asume que las interacciones positivas o negativas entre los sitios, resultan en desviaciones de los valores esperados de  $K_i$  (ver ecuación [53]), debido a un cambio en el factor estadístico ( $d_i$ ) y/o un cambio en la constante de afinidad intrínseca en si.

El análisis de datos experimentales para la unión del  $O_2$  y/o el  $CO$  a la hemoglobina muestra que en términos de distribuciones de afinidad, al menos dos diferentes subpoblaciones son generadas durante la reacción (figs. 16 y 19). Una tercera subpoblación, que se predice teóricamente, puede observarse solo a concentraciones muy elevadas de ligando libre, probablemente fuera del rango de valores fisiológicos. La unión cooperativa del  $O_2$  a la hemoglobina asegura la captura, transporte y liberación de este ligando en un rango muy angosto de valores de presión parcial de  $O_2$ , que distingue a los pulmones ( $pO_2 \approx 100$  mmHg) del resto de los tejidos ( $pO_2 \approx 30-40$  mmHg). Bajo estas condiciones, este tercer estado molecular puede ser muy difícil de detectar experimentalmente. Las distribuciones obtenidas reflejan diferentes estados moleculares como función de cambios en la afinidad, que pueden estar relacionados con las funciones moleculares de captura, transporte y liberación de  $O_2$ .

De acuerdo con Mills et al. (Mills et al, 1976), la hemoglobina puede presentar tres principales estados energéticos como función del grado de oxigenación, que corresponden a las especies moleculares (i) libre, (ii) monoligada, y (iii) triple y cuádruplemente ligada. Nuestros resultados apoyan la posibilidad de que un balance energético similar pudiera representar un promedio sobre una distribución de estados conformacionales que cambian como función del estado de ligación. El caso mas simple en este escenario

podría representar al modelo de dos estados de Monod et al. (Monod et al, 1965).

Tanto las curvas de saturación para los modelos MWC y KNF como sus correspondientes  $n(k)$  y SADs, son prácticamente indistinguibles entre sí, así como las obtenidas directamente de la función de partición en la ecuación [59]. Puesto que cada constante termodinámica  $K_i$  representa un promedio de todas las constantes de sitio  $k_{ij}$  particulares para conformar isómeros configuracionales con  $i$  ligandos unidos, todas las combinaciones de los 9 posibles valores  $k_{ij}$  para el tetrámero de hemoglobina, que resulten en el mismo valor de  $K_i$ , podrán ajustar una isoterma de fijación idéntica. De esta forma, un número enorme de conjuntos de 9 constantes  $k_{ij}$  pueden predecir una misma curva experimental, puesto que la forma de dicha curva está determinada únicamente por las potencias sucesivas de la concentración de ligando ( $F$ ). El ajuste numérico de un conjunto de datos  $r$  como función de  $F$ , puede resolver de manera precisa solamente los 4 parámetros  $K_i$  que mejor se ajusten, pero no puede proporcionar valores únicos para las 9 constantes sitio-específicas.

Las  $T_i(K_i)$ s no parecen ser capaces de discriminar entre los diferentes modelos de cooperatividad, puesto que las cuatro distribuciones de afinidad termodinámicas obtenidas no ofrecen información acerca de un único conjunto de  $k_{ij}$ , y no pueden explicar mecanismos moleculares cuyas reglas involucren propiedades específicas a nivel de estos microestados.

En la hemoglobina, el segundo paso de fijación se caracteriza porque tanto la SAD como la SAD son multimodales. Esto podría indicar una especie de umbral energético alrededor del segundo paso de fijación, y es consistente con resultados experimentales de Perrella y Di Cera (Perrella & Di Cera, 1999). Su análisis de la distribución de estados de ligación intermedios, como función de la saturación revela una fuerte cooperatividad desde los dos primeros pasos de fijación.

A pesar de que no podemos asignar ninguna de las conformaciones T o R a ninguna de las subpoblaciones obtenidas en este trabajo, la distribución de

afinidades que encontramos apoya el resultado de Ackers y sus asociados (Di Cera, 1995; Ackers & Hazzard, 1993; Perutz, et al., 1998), quienes han utilizado las funciones de Wyman (Wyman, 1964; Perutz et al., 1998) para predecir la afinidad por el O<sub>2</sub> de todos los posibles estados de ligación, a partir del estudio de la disociación de tetrámeros en dímeros de hemoglobinas híbridas, en las cuales una o más de las subunidades contienen complejos Fe<sup>3+</sup>CN<sup>-</sup>, las cuales se combinan con subunidades deoxigenadas, cuyos grupos hemo se encuentran en estado ferroso (Ackers, 1993). Sus resultados muestran que los 10 posibles microestados moleculares pueden distinguirse por tres diferentes constantes de disociación dímero-tetrámero, las cuales corresponden a tres diferentes energías libres. Ackers y su grupo, propone un código molecular para la hemoglobina, en el que la transición del estado T al R ocurre como resultado de combinaciones sucesivas de hemos con O<sub>2</sub> que requieren al menos de un grupo hemo ligado en cada dímero  $\alpha\beta$ .

Aun cuando el mecanismo del código molecular propuesto por Ackers ha sido cuestionado (Perutz et al., 1998), la búsqueda de un intermediario estable entre el estado T y R continua. Una tercera estructura cuaternaria ha sido propuesta por diversos grupos para la hemoglobina (Silva et al., 1992; Perutz et al., 1998). Esta estructura se relaciona con las conformaciones R y T mediante la rotación y traslación del dímero  $\alpha_1\beta_1$  en relación al  $\alpha_2\beta_2$ , pero cuyos ejes de movimiento son diferentes de aquellos que relacionan la transición del estado T al R. En esta última, un dímero  $\alpha\beta$  gira en relación al otro 13.2°, mientras que para el estado intermediario, que se ha denominado R2, este ángulo de giro tiene aproximadamente 10° más del observado para R (Perutz et al., 1998). La traslación a lo largo de los contactos  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_2$  también es mayor que el observado en la transición de la estructura T a la R. Una estructura cuaternaria muy similar a R2 ha sido reportada para la hemoglobina humana Hb *Ypsilanti*, que resulta de la mutación de la asparagina G1 $\beta$  por una tirosina (Smith et al., 1991; Perutz et al., 1998). En un principio, la estructura R2 se relacionó con la captura de protones que acompañan la oxigenación a valores de pH menores a 6.0, lo cual se conoce como efecto Bohr ácido o reverso; sin embargo, el análisis

de la estructura tridimensional de la configuración R2, no revela ningún grupo ionizable capaz de captar protones en la transición de T a R2 (Perutz et al., 1998). Si el pKa del equilibrio  $R \leftrightarrow R2$  coincidiera con la transición del efecto Bohr de alcalino a ácido, entonces alrededor del 2% de la oxihemoglobina se encontraría en la forma R2 a pH 7.4, pero esta fracción podría aumentar significativamente en el músculo metabólicamente activo. Existe controversia en torno a si la estructura R2 podría ser un intermediario en la transición de la estructura T a la R, o si se trata de una estructura a la que solo puede accederse desde el estado R (Perutz et al., 1998). Existen otras evidencias de un posible intermediario estructural en la transición del estado T al R, pero estos intermediarios tienen en general una vida media muy corta o son muy inestables (Schumacher et al., 1995; Perutz, et al., 1998).

La distribución de afinidades observada en el presente trabajo nos indica que durante la oxigenación existe una transición entre al menos dos estados energéticos de la molécula de hemoglobina. La posibilidad de que estos estados puedan relacionarse con las configuraciones conformacionales conocidas, y que la tercera moda observada en dichas distribuciones pueda estabilizarse por otros métodos que afecten tanto la afinidad como las transiciones estructurales, (por ejemplo la manipulación del pH), debe explorarse por otros métodos.



ACADEMIC  
PRESS

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Analytical Biochemistry 313 (2003) 226–233

ANALYTICAL  
BIOCHEMISTRY

[www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)

## Positive cooperativity induces multimodal site and thermodynamic affinity distributions in multivalent proteins

María del Mar Hernández and Marco V. José\*

Grupo de Biología Teórica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico

Received 8 July 2002

### Abstract

The characterization of the stoichiometric and site-affinity distributions for the reaction of hemoglobin with O<sub>2</sub> and CO is presented as an example of a multivalent receptor system which exhibits positive site-site interactions. The distributions of stoichiometric constants,  $T_i(K_i)$ 's, are obtained assuming that the distribution of site constants,  $N(k)$ , is known. The importance of these distributions is that they can be directly related to quantities measured experimentally and that they represent affinity distributions for each ligation step. In hemoglobin, positive site-site interactions generate both stoichiometric and site-affinity distributions with complex and previously unrecognized multimodal patterns that are very different from the theoretical distributions obtained in the absence of interactions. These distributions are related to the generation of heterogeneity during the ligand binding process. Experimental binding data show that these complex distributions can be related to the physiological functions of uptake, transport, and release of gaseous ligands by hemoglobin.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** Stoichiometric affinity distributions; Site-affinity distributions; Hemoglobin; Cooperativity; Ligand binding models

Molecular biophysicists and biochemists have long been intrigued by the concept of molecular codes for the structure and function of biological macromolecules, in which a set of rules translate the multiple combinations of simple structural elements into a more complex phenomenon of biological function. Considerable attention has been devoted to characterizing the interactions by which ligands and receptors, in this case, allosteric proteins are in thermodynamic equilibrium.

Several methods have been developed to characterize heterogeneous receptor populations in terms of affinity distributions from binding data [1]. The general strategy for characterizing heterogeneous receptor systems has traditionally been to determine the probability density function (pdf)<sup>1</sup> of affinities from the binding isotherms, which represents a cumulative frequency distribution of affinities. All these methods deal with site-affinity dis-

tributions (sad) in terms of the microscopic binding constant usually denoted by  $k$  [2–5]. A complex reaction can be described by assuming that there are different types or classes of independent binding sites. Quantitatively, such a system will obey an equation of the form

$$r = r(F) = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i F}{1 + k_i F}, \quad (1)$$

where  $r$  is the ratio of the concentration of bound ligand to the total concentration of the receptor,  $n_i$  is the number of sites in class  $i$ , and  $k_i$  is the site binding constant for the  $i$ th class. The total number of sites  $n_0$  is given by

$$n_0 = \sum_{i=1}^m n_i. \quad (2)$$

If the values of  $n_i$  are displayed graphically as a function of the logarithm of  $k$ , the result is the discrete distribution or spectrum of site binding constants, which can be used to characterize the reaction. Eq. (1) represents the Scatchard model for heterogeneous and non-interacting binding sites [6].

\* Corresponding author. Fax: +52-5-622-3894.

E-mail address: [jose@servidor.unam.mx](mailto:jose@servidor.unam.mx) (M.V. José).

<sup>1</sup> Abbreviations used: pdf, probability density function, sad, site-affinity distribution; SAD, stoichiometric affinity distribution.

We can replace the discrete distribution,  $n_i(k_i)$ , with a continuous one,  $N(k)$ , without loss of generality [1,7], since the continuous spectrum can be composed of very narrow peaks, which closely simulate the discrete spectrum.

For such a system, Eqs. (1) and (2) are replaced by

$$r = v \int_0^{\infty} \frac{N(k)kF}{1+kF} dk, \quad (3)$$

with

$$v = \int_{-\infty}^{\infty} N(k) d(\log k), \quad (4)$$

where  $N(k)$  is the unknown site-affinity distribution,  $v$  is the valence of the receptor and  $F$  is the free ligand concentration. In this form,  $N(k) d(\log k)/v$  represents the probability that a site, selected at random, will have an affinity between  $\log k$  and  $\log k + d(\log k)$  on a receptor molecule. In other words,  $N(k)$  defines the affinity spectrum as a continuous function of  $\log k$ .

Several methods have been directed at finding exact [8] or approximate solutions to this integral equation, but these solutions (exact or approximate) rely on very specific assumptions [9,10]. The logarithmic transform of this isotherm will appear to be linear only for homogeneous and nearly normally distributed populations. For asymmetric cases, as in hemoglobin and other molecules with site-site interactions, it will become nonlinear at both low and high ligand concentrations. As before, the binding reaction can be characterized by evaluating  $N(k)$ . The advantage is that it is no longer necessary to assume a value for  $v$ .

Although in practice it is not possible to use an exact solution for  $N(k)$ , several approximation techniques are available [1,7]. Recently a statistical approach to characterizing the stoichiometric affinity distributions (SAD) of heterogeneous receptor populations was developed [3,11]. These thermodynamic distributions are marginal densities which can be used to decompose a ligand binding process into affinity distributions that correspond to the sequential formation of receptor molecules with one, two, or  $v$  binding sites. The importance of these distributions is that they can be related to quantities measured experimentally and that they represent affinity distributions for each ligation step. Furthermore, they can be applied to cases where there are positive and/or negative site-site interactions.

Hemoglobin has been studied extensively as a classic prototype for protein assemblies that undergo molecular "switching" during their functional behavior. This molecule has long served as a paradigm for cooperative proteins [12,13]. In hemoglobin, as in many allosteric proteins, the straightforward analysis of binding data is complicated by site-site interactions generated during the reaction. The highly cooperative nature of the  $O_2$  binding isotherm naturally suppresses the contributions

of the singly, doubly, and triply ligated species, making it very difficult to discriminate models of cooperativity [14–16]. It has long been recognized that the overall shape of the  $O_2$  binding curve is consistent with several models of cooperativity [14], and does not provide conclusive discrimination.

Since hemoglobin operates essentially as an equilibrium thermodynamic system in vivo, the problem of delineating its structure-function relationships becomes one of establishing relationships between changes in thermodynamic and structural properties that accompany the molecule's functional cycle of oxygenation-deoxygenation.

The goal of this paper is to obtain the sad and SADs for the reaction of hemoglobin with CO and  $O_2$  by means of a finite difference method [7,17,18], which has been shown to be useful for distributions of arbitrary shape [1], such as those involving site-site interactions. Although we present the case of hemoglobin, this is a general method that can be used to analyze the ligand binding of multivalent receptor systems showing positive, negative or no interactions.

## Theory

### *Stoichiometric affinity distributions in heterogeneous systems with multivalent receptors*

Let us assume a heterogeneous system consisting of subpopulations with different binding affinities, showing no interactions. In this case, the stoichiometric constants  $K_i$  of each subpopulation are related to the site binding constant  $k$  by [19]

$$K_i = \left( \frac{v-i+1}{i} \right) k \equiv d_i k. \quad (5)$$

If  $k$  is a random variable with pdf  $N(k)$ , then the equilibrium constant  $K_i$  governing the binding of the  $i$ th monovalent ligand to a receptor ( $i = 1, \dots, v$ ) has a pdf  $T_i$  given by

$$T_i(K_i) = \int N(k) \delta(K_i - d_i k) dk, \quad (6)$$

where  $\delta(\cdot)$  is the Dirac delta function. Evaluating this integral gives

$$T_i(K_i) = N(K_i/d_i)/d_i. \quad (7)$$

Here the SAD is obtained by simply rescaling the functional form of the sad. Note that the rescaling of the  $K_i$  values is given by  $d_i$  factors. To obtain  $N(k)$  in terms of all the  $T_i(K_i)$ 's note that, for example, if  $v = 4$ , then  $d_1 T_1(d_1 k) = N(k)$ ,  $d_2 T_2(d_2 k) = N(k)$ ,  $d_3 T_3(d_3 k) = N(k)$ , and  $d_4 T_4(d_4 k) = N(k)$ ; therefore,  $N(k) = 1/4[d_1 T_1(d_1 k) + d_2 T_2(d_2 k) + d_3 T_3(d_3 k) + d_4 T_4(d_4 k)]$ .

Thus for any value of  $v$  we have

$$N(k) = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^v d_i T_i(K_i), \quad (8)$$

where  $K_i = d_i k$ . This equation states that in the case of heterogeneous systems with multivalent receptors,  $N(k)$  can be expressed as a weighted average over all the  $T_i(K_i)$ 's. Note that Eq. (8) is valid when the pdf is continuous. When the pdf is discrete the Dirac delta function is replaced by the Kronecker delta.

If  $K_i = d_i' k$ ,  $i = 1, 2, \dots, v$ , with  $d_i'$  a deterministic constant, possibly different from the  $d_i$  given in Eq. (5) and that takes into account site-site interactions, then Eqs. (7) and (8) continue to hold after replacement of  $d_i$  with  $d_i'$ . Moreover,  $\ln(K_i) = \ln(d_i') + \ln(k)$ , and provided that variance of  $\ln k$  exists, we have [3]

$$\begin{aligned} \text{var}(\ln(k)) &= \text{var}(\ln(K_1)) = \text{var}(\ln(K_2)) = \dots \\ &= \text{var}(\ln(K_v)). \end{aligned} \quad (9)$$

Eq. (9) states that under the logarithmic transformation of the affinity, the variance is an invariant of the affinity distributions.

#### Stoichiometric affinity distributions of hemoglobin

Let us now assume that  $N(k)$  is a continuous distribution. Then  $N(k)$  can be evaluated by a finite difference method [7,17,18], which gives

$$n(k) = \left. \frac{r(aF) - r(F/a)}{2 \log_{10} a} - \frac{a}{(a-1)^2} \right|_{F=1/k}, \quad (10)$$

where  $a$  is an arbitrary constant greater than 1 (a reasonable compromise is  $a = 1.585$  (1,5,10), and  $r$  and  $F$  are defined as in Eq. (3). Both  $N(k)$  and  $n(k)$  are equivalent and related by the change of variables  $kd(\log_{10} k) = 0.4343dk$ . This method is chosen because it is suggested to work for an arbitrary shape of the sad [6]. The macroscopic affinity distributions,  $T_i(K_i)$ 's, can then be simply constructed using Eq. (8).

To formulate the SADs for the hemoglobin tetramer, we must consider the general relationships between the stoichiometric and the site binding constants. The hemoglobin subunits  $\alpha$  and  $\beta$  assembled in a tetramer form two structurally nonequivalent  $\alpha\beta$  contacts and yield 10 possible ligation states. These states define the partition function independent of the model, representing the ligand binding to the four hemes of hemoglobin as follows [16,20],

$$\begin{aligned} Z &= 1 + 2(k_\alpha + k_\beta)F \\ &+ [c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 2(c_{\alpha\beta} + c'_{\alpha\beta})k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2]F^2 \\ &+ 2(c_{\alpha\alpha\beta}k_\alpha + c_{\alpha\beta\beta}k_\beta)k_\alpha k_\beta F^3 + c_{\alpha\alpha\beta\beta}k_\alpha^2 k_\beta^2 F^4, \end{aligned} \quad (11)$$

where  $F$  is the ligand concentration or partial pressure, as in the case of a gaseous ligand,  $k_\alpha$  and  $k_\beta$  are the binding constants for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits when all other subunits are unligated,  $c_{\alpha\alpha}$ ,  $c_{\alpha\beta}$ ,  $c'_{\alpha\beta}$ , and  $c_{\beta\beta}$  are the second-order interaction constants between the four possible pairs of chains,  $c_{\alpha\alpha\beta}$  and  $c_{\alpha\beta\beta}$  are the third-order interaction constants involving the two possible triplets of chains, and  $c_{\alpha\alpha\beta\beta}$  is the fourth-order interaction constant involving all chains. The  $c$  values reflect the presence of positive ( $c > 1$ ), negative ( $c < 1$ ) or no interactions ( $c = 1$ ). Since there are 10 possible configurations in Eq. (11), 1 of which is used as reference, then there must be 9 independent reactions among the possible intermediates and an equivalent number of independent equilibrium constants.

Eq. (11) can then be used to evaluate  $r$  as

$$r = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln F}. \quad (12)$$

$r$  can also be evaluated directly from the binding data or by using the Adair formalism [21], which takes into account the four possible ligation states without discriminating between hemoglobin chains. In a stepwise process, only a fraction of all the macroscopic species can be formed for each binding event. The site-specific description of ligand binding to the four hemes of hemoglobin in Eq. (11) can be related to the four macroscopic Adair constants as follows:

$$\begin{aligned} K1 &= \frac{k_\alpha + k_\beta}{2}, \\ K2 &= \frac{1}{3} \left( \frac{c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 2(c_{\alpha\beta} + c'_{\alpha\beta})k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2}{k_\alpha + k_\beta} \right), \\ K3 &= \frac{3(c_{\alpha\alpha\beta}k_\alpha + c_{\alpha\beta\beta}k_\beta)k_\alpha k_\beta}{c_{\alpha\alpha}k_\alpha^2 + 2(c_{\alpha\beta} + c'_{\alpha\beta})k_\alpha k_\beta + c_{\beta\beta}k_\beta^2}, \\ K4 &= \frac{2c_{\alpha\alpha\beta\beta}k_\alpha k_\beta}{c_{\alpha\alpha\beta}k_\alpha + c_{\alpha\beta\beta}k_\beta}. \end{aligned} \quad (13)$$

All the site and thermodynamic distributions and the nonlinear fittings of the saturation curves were carried out by using ad hoc programs developed in Matlab version 5.3 and they are available upon request.

#### Results

In Fig. 1a, we show the theoretical binding isotherm of a homogeneous population of a tetravalent receptor in the absence of site-site interactions, which reacts with

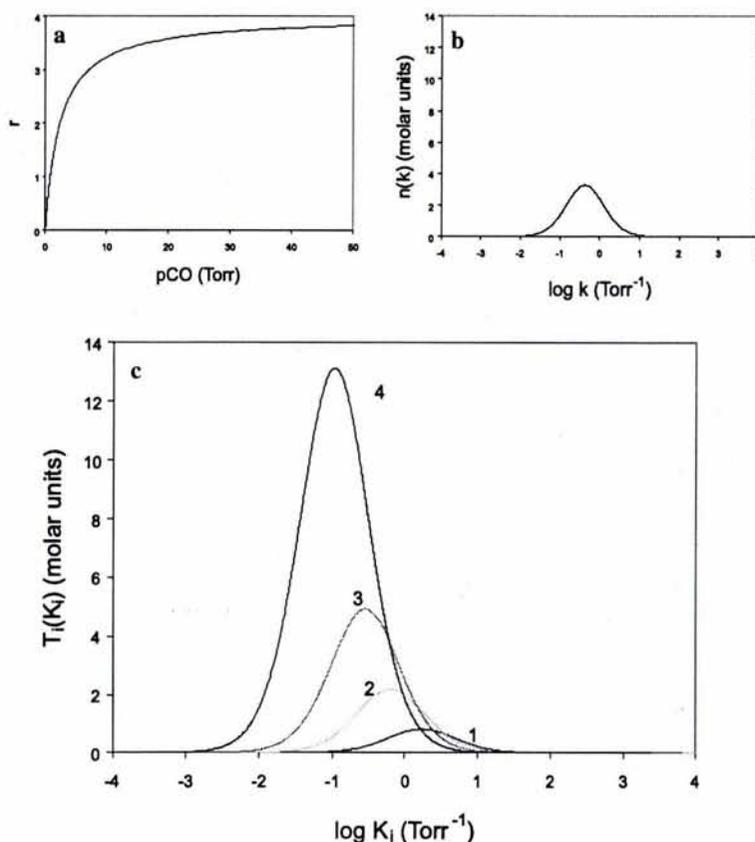


Fig. 1. Binding isotherm and corresponding sad and SADs of a homogeneous tetravalent receptor interacting with a monovalent ligand (CO) without site-site interactions. (a) Cumulative frequency distribution of affinities. (b) Theoretical site-affinity distribution ( $n(k)$ ). (c) Corresponding stoichiometric distributions of affinities ( $T_i(K_i)$ 's) for every ligation step. ( $K_1 = 1.7$ ,  $K_2 = 28$ ,  $K_3 = 1.3 \times 10^2$ ,  $K_4 = 1 \times 10^3$ ).

a monovalent ligand. Figs. 1b and c show the corresponding  $n(k)$  and SADs. To simulate a tetravalent molecule without site-site interactions, we used the reported value for the stoichiometric Adair constant  $K_1$ , as reported by Perrella and Di Cera [20], for the reaction of hemoglobin with CO. Eq. (5) was then used to generate the remaining  $K_i$  values. The distribution  $n(k)$  (Fig. 1b) is derived from the corresponding binding isotherm (Fig. 1a) by estimating  $r$  at a series of four different values of  $F$ , as indicated by Eq. (10). The SADs were then calculated via Eq. (8).

Note that in the absence of site-site interactions,  $n(k)$  and the four SADs are log-normal and they are similar in shape. The distributions are plotted with their respective abscissa scales to illustrate that  $n(k)$  is proportional to an average of  $T_1(K_1)$ ,  $T_2(K_2)$ ,  $T_3(K_3)$ , and  $T_4(K_4)$  as stated in Eq. (8). Note that the range of affinity values for  $T_1(K_1)$  is higher than the range of affinity values in which  $T_2(K_2)$  lies, and the same happens for  $T_3(K_3)$  and  $T_4(K_4)$ . This means that the molar concentration of molecular species with one, two, or more bound ligands is not the same at different ranges of affinities.

We used the four Adair constants of the sequential binding of CO to hemoglobin as reported by Perrella

and Di Cera [20] to generate the binding isotherm in Fig. 2a. When site-site interactions are included, the distribution pattern is very different. Note that in this case, the sad and SADs are multimodal (Figs. 2b and c). Each binding step seems to be generating at least two clearly different and well-defined subpopulations, which are characterized by different affinities and relative frequency. One of these subpopulations shows high affinity, but low relative frequency, while the other one is characterized by lower affinity and higher frequency. A third subpopulation, showing the lowest affinity, is left-truncated; the rest of the curve may be obtained when the ligand concentration used in the simulation exceeds the experimental values, and it would have the same relative frequency as the high-affinity subpopulation, generating a theoretical symmetric trimodal affinity distribution.

Analysis of the binding curve in terms of the Adair formalism involves only four independent parameters, as opposed to nine in the site-specific one [16]. It follows from the definition of the Adair constants in Eq. (13), that different combinations of the 10 ligated states of hemoglobin can be translated into the same pattern of stepwise macroscopic constants and, therefore, to the same SAD.

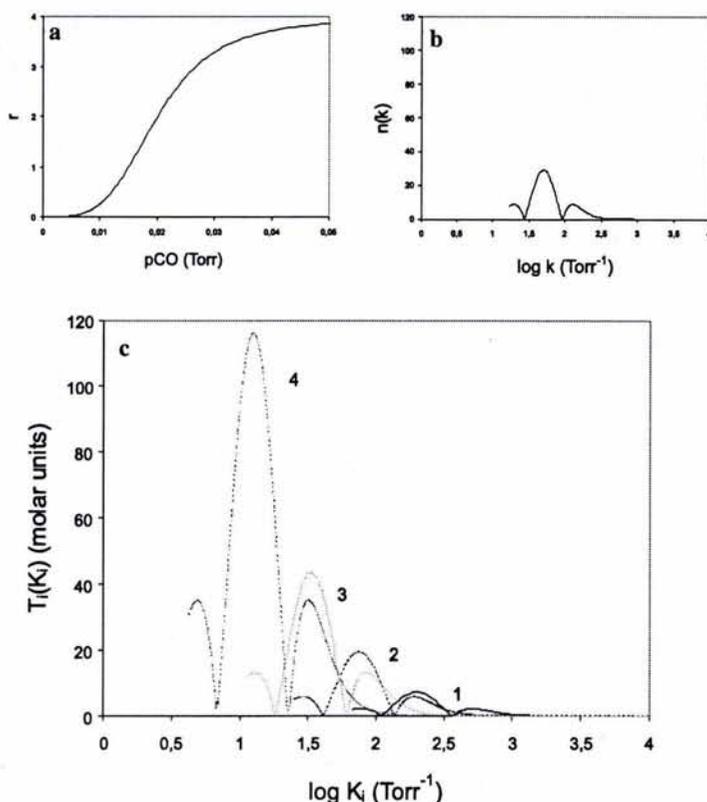


Fig. 2. Binding isotherm and corresponding sad and SADs of hemoglobin reacting with CO (a), Cumulative frequency distribution of affinities. (b) Site-affinity distribution ( $n(k)$ ). (c) Stoichiometric affinity distributions (numbered from 1 to 4) in which each  $T_i(K_i)$  is plotted versus  $\log K_i$ .

Fig. 3a shows the theoretical cumulative frequency distributions, which represent the binding isotherms per binding step reconstructed using Eqs. (11) and (12), and the site-specific parameters published by Perrella and Di Cera [20] for the reaction of hemoglobin with CO. Fig. 3b shows the corresponding sad's. It is interesting to notice that both the sad's and the SADs appear to be trimodal, except for the first ligation step, which is normally distributed in the sad. This is not surprising, since the behavior of the first ligation step closely resembles the one observed in the absence of interactions. In both cases, we are dealing with homogeneous and independent binding sites.

Using experimental binding data taken from Boeri ([22], and references therein), we were able to obtain the actual probability distribution of affinities for the binding reaction of hemoglobin to O<sub>2</sub>. Fig. 4a shows the fitting of the experimental data points using the general solution of the logistic equation

$$r = r_i + \frac{r_r - r_i}{1 + \gamma e^{-\sigma(pO_2/p50)}} \quad (14)$$

where the lower ( $r_i$ ) and upper ( $r_r$ ) plateaus establish the minimal and maximal saturation, respectively;  $pO_2$  is the partial pressure of O<sub>2</sub>,  $p50$  is the partial pressure of O<sub>2</sub> at half saturation, and  $\sigma$  and  $\gamma$  determine the range and slope of the linear region of the mean  $r$

versus  $pO_2$  curve. In this case  $n(k)$  and all the  $T_i(K_i)$ 's also show multimodal distributions similar to those in Figs. 2 and 3. Only two of the modes are well defined, and a third mode could be only partially observed. The rest of this mode would be detected beyond saturating values of ligand concentration, which are normally out of the experimental observations for being considered not physiologically relevant.

This result indicates that positive cooperativity generates at least two different subpopulations as soon as two sites are ligated (see also Fig. 3b). As shown in Figs. 4b and c,  $n(k)$  and the  $T_i(K_i)$ 's allow us to analyze, in terms of the number of ligated sites, the kind of molecular species that are involved in generating the subpopulations observed in  $n(k)$ . Figs. 4b and c show that the first mode of  $n(k)$  represents a molecular state with high affinity, which is composed of molecular species having essentially one or two bound sites. The second and more frequent subpopulation in  $n(k)$  seems to be a mixed subpopulation, representing molecular species having primarily three bounded sites, but also two and even a very small fraction of molecules having its four sites bounded, but not molecules with only one site occupied. The third mode would include the region of triply and quadruply ligated molecules only, but as we have already pointed out, this third subpopulation might be very difficult to detect experimentally. The generation of

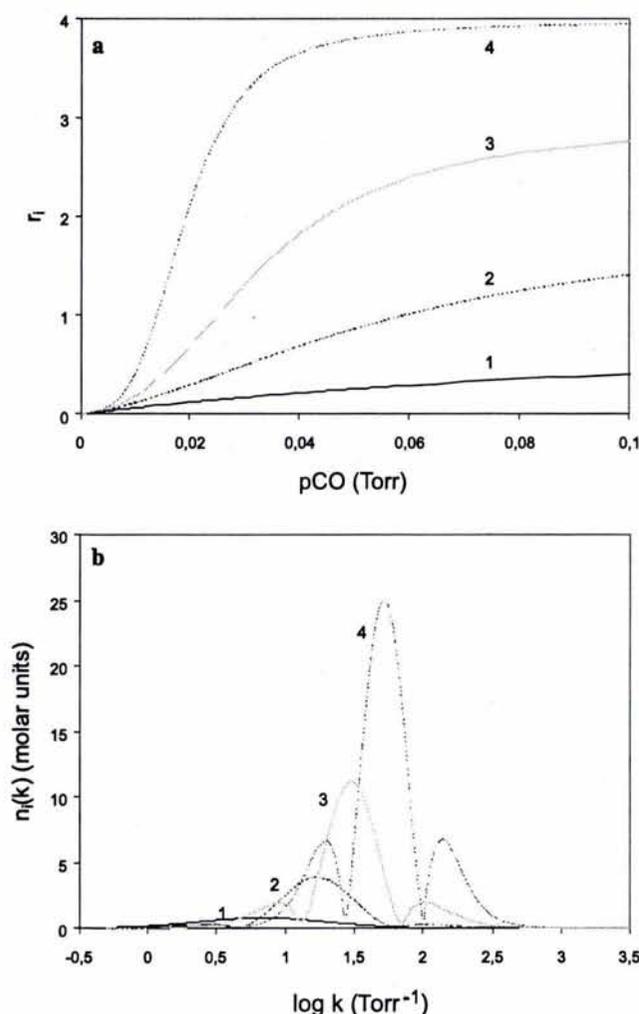


Fig. 3. Binding isotherms for each ligation step of hemoglobin's reaction with CO, and corresponding sad's. (a) Cumulative frequency distributions of affinities per binding step, numbered according to step of ligation. (b) Theoretical site-affinity distributions for each ligation step ( $n(K_i)$ ) ( $k_\alpha = 1.1$ ,  $k_\beta = 2.3$ ,  $c_{\alpha\alpha} = 49$ ,  $c_{\alpha\beta} = c'_{\alpha\beta} = 16$ ,  $c_{\beta\beta} = 13$ ,  $c_{\alpha\alpha\beta} = 2.4 \times 10^3$ ,  $c_{\alpha\beta\beta} = 1.1 \times 10^3$ ,  $c_{\alpha\alpha\beta\beta} = 1.1 \times 10^3$ ). Note that here we are using a single abscissa scale instead of four scales that were used in Fig. 2.

heterogeneous subpopulations in terms of affinity for O<sub>2</sub> or CO can be clearly related to the physiological role of hemoglobin, since this molecule is able to react in accordance with the surrounding conditions. One of these subpopulations might serve as a transient antenna state, which binds the first ligand molecules, inducing cooperativity. This antenna state would appear under conditions promoting high affinity (e.g., in the lungs where the  $pO_2$  is high enough to achieve nearly total saturation). The second subpopulation, which presents the highest frequency, could be found under a series of conditions that would generate intermediate values of affinities, leading to a presumably tightly bound O<sub>2</sub> carrier, and which may be related to the hemoglobin's function of O<sub>2</sub> transportation. It represents the carrier state. A third molecular state could be found under conditions that

promote the dissociation of O<sub>2</sub> from its carrier. This is a transient state showing very low affinity and so acting as a releaser of the gaseous ligand.

## Discussion

In this paper we have obtained the sad and SADs for characterizing the cooperative binding of hemoglobin with a monovalent gaseous ligand. This characterization provides a new way to analyze the effect of site-site interactions in terms of continuous affinity distributions of arbitrary shape. The finite difference method we have used to obtain  $n(k)$  is numerically simple and easily applicable to experimental data.

The multimodality observed in both the sad and the SADs was unanticipated and could be related to the generation of heterogeneity during the binding process when positive site-site interactions are involved. It has long been recognized that negative site-site interactions are in themselves a source of affinity heterogeneity generated during the saturation process [2,11], but the explicit contribution of positive cooperativity to the shape of the sad and SADs are considered here for the first time.

The thermodynamic constants and their ratios reflect the O<sub>2</sub>-driven structure changes that accompany the saturation process, since they can be directly related to the molar free energy ( $\Delta G_i = -RT \ln K_i$ ) of reacting a deoxytetramer with a stoichiometric number of ligand molecules corresponding to the possible number of ligated hemes. Because stoichiometric binding constants do not refer to the particular site configurations within the tetramer [23], the  $T_i(K_i)$ 's give a thermodynamic probability distribution of affinities per binding step. Moreover, the stoichiometric binding constants are macroscopic thermodynamic entities which by definition are experimentally measurable, in contrast to the site constants, which are microscopic statistical mechanical variables that cannot be measured directly [10,23]. It is shown here that in the absence of site-site interactions, the sad and SADs are both unimodal and symmetric; but when positive site-site interactions are involved, the corresponding theoretical distributions are all multimodal. Positive site-site interactions will, in theory, produce symmetric distributions if ligand concentrations are increased systematically and will not influence the variance of  $\ln K_i$ 's. However, actual experimental affinity distributions seem not to be symmetric (Fig. 4).

In principle, the stoichiometric constants can take site-site interactions into account and they may provide a way to characterize a heterogeneous binding system as the saturation process occurs. The thermodynamic stoichiometric treatment assumes that positive or negative site-site interactions result in deviations from expected values of  $K_i$  (see Eq. (5)), because of a change

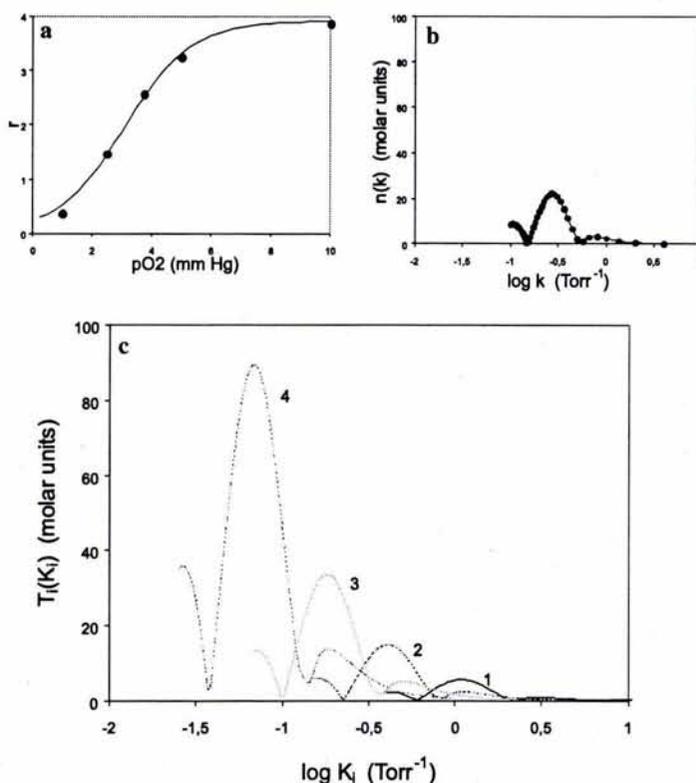


Fig. 4. (a) Saturation curve of hemoglobin as a function of  $pO_2$ . Experimental data (●); nonlinear fitting (—). (b) Corresponding sad ( $n(k)$ ), (c) Stoichiometric affinity distributions;  $T_i(K_i)$ 's are numbered according to the corresponding ligation step.  $\sigma = 2.513$ ,  $\gamma = 16$ , and determination coefficient  $R^2 = 0.92$ .

in the statistical factor ( $d_i$ ) and/or a change in the site-affinity constants.

The analysis of experimental data for the binding of CO and/or  $O_2$  to hemoglobin shows that in terms of affinity distributions, at least two different subpopulations are generated during the reaction (Figs. 2–4). A third subpopulation, which is predicted theoretically, can be observed only at very high ligand concentrations, probably out of the physiological range. The cooperative binding of  $O_2$  ensures uptake, transport, and release of this ligand over the comparatively narrow range of partial  $O_2$  pressures that distinguishes the lungs ( $pO_2 \sim 100$  mmHg) from the tissues ( $pO_2 \sim 30$ – $40$  mmHg). Under these conditions, this third molecular state might be very difficult to detect experimentally. The distributions obtained reflect different molecular states as a function of affinity changes that could be related to the molecular functions of uptake, transport, and release of  $O_2$ .

According to Mills et al. [24], three major energetic states are apparently assumed by hemoglobin as a function of oxygenation and correspond to (i) unligated, (ii) singly ligated, (iii) and triply and quadruply ligated species. Our results support the possibility that a similar energy balance could represent an average over a distribution of conformational states that changes as a function of ligation. The simplest case in this scenario would correspond to the two-state model of Monod et al. [15].

In hemoglobin, the second ligation step is characterized by multimodal sad and SAD. This could be indicative of a switchover point around the second ligation step, and it is consistent with results from Perrella and Di Cera [20]. Their analysis of the distribution of CO-ligated intermediates as a function of saturation reveals strong cooperativity already in the first two ligation steps.

Although we cannot assign the T or R conformations to any of the molecular subpopulations that are reported here, the distributions of affinities that we found support the result of Ackers and associates [16,26,25], who used Wyman's linkage relations to analyze the  $O_2$  affinities of all possible intermediate states of ligation in hemoglobin. They showed that the 10 possible molecular microstates were distinguished by three different tetramer–dimer dissociation constants, corresponding to three different free energies. They proposed a molecular code for hemoglobin's cooperativity, with the T to R transition occurring, not randomly, as successive hemes combine with  $O_2$ , but requiring at least one heme to be ligated on each  $\alpha\beta$ -dimer.

#### Acknowledgments

We thank Claudia Lerma for her valuable technical assistance, Tzipe Govezensky for helpful conversations

and careful reading of the manuscript, and Juan R. Bobadilla for technical support. M.V.J. was financially supported by UNAM PAPIIT Project IN213199.

## References

- [1] A.K. Thakur, P.J. Munson, D.L. Hunston, D. Rodbard, Characterization of ligand-binding systems by continuous affinity distributions of arbitrary shape, *Anal. Biochem.* 103 (1980) 240–254.
- [2] M.V. José, C. Larralde, Alternative interpretation of unusual Scatchard plots: contribution of interactions and heterogeneity, *Math. Biosci.* 58 (1982) 159–170.
- [3] M.V. José, J. José, Probability distributions of thermodynamic affinities for heterogeneous receptor populations, *J. Theor. Biol.* 190 (1998) 85–92.
- [4] L. Pauling, D. Pressman, A.L. Grossberg, The serological properties of simple substances. VII. A quantitative theory of the inhibition by haptens of the precipitation of heterogeneous antisera with antigens, and comparison with experimental results for polihaptenic simple substances and azoproteins, *J. Am. Chem. Soc.* 66 (1944) 784–792.
- [5] R. Sips, On the structure of a catalyst surface, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 490–495.
- [6] G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660–672.
- [7] D.L. Hunston, Two techniques for evaluating small molecule–macromolecule binding in complex systems, *Anal. Biochem.* 63 (1975) 99–109.
- [8] J.D. Bowman, F. Aladjem, A method for the determination of heterogeneity of antibodies, *J. Theor. Biol.* 4 (1963) 242–253.
- [9] J.E. Fletcher, A.A. Spector, J.D. Ashbrook, Analysis of macromolecule ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants, *Biochemistry* 9 (1970) 4580–4587.
- [10] I.M. Klotz, D.L. Hunston, Protein interactions with small molecules. Relationships between stoichiometric binding constants, site binding constants and empirical parameters, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 3001–3009.
- [11] M.V. José, J.V. José, Thermodynamic distributions of heterogeneous receptor populations, in: R.B. Raffa (Ed.), *Drug-Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications*, Wiley, New York, 2001, pp. 593–601.
- [12] M.F. Perutz, Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin, *Nature* 228 (1970) 726–739.
- [13] M.F. Perutz, Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins, *Q. Rev. Biophys.* 22 (1989) 139–236.
- [14] D.E. Koshland, G. Némethy, D. Filmer, Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry* 5 (1966) 365–385.
- [15] J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeaux, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88–118.
- [16] E. Di Cera, *Thermodynamic Theory of Site-specific Binding Processes in Biological Macromolecules*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.
- [17] K. Ninomiya, J.D. Ferry, Some approximate equations useful in the phenomenological treatment of linear viscoelastic data, *J. Colloid Sci.* 14 (1959) 36–48.
- [18] J.D. Ferry, in: *Viscoelastic Properties of Polymers*, second ed., Wiley, New York, 1970 (Chapter 4).
- [19] I.M. Klotz, The application of the law of mass action to binding proteins. Interactions with calcium, *Arch. Biochem.* 9 (1946) 109–117.
- [20] M. Perrella, E. Di Cera, CO ligation intermediates and the mechanism of hemoglobin cooperativity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2605–2608.
- [21] G.S. Adair, The hemoglobin system. VI: The oxygen dissociation curve of hemoglobin, *J. Biol. Chem.* 63 (1925) 529–545.
- [22] E. Boeri, Enzyme reactions, in: *Physicomathematical Aspects of Biology*, Proceedings of the international School of Physics, Academic Press, New York, 1962, p. 95.
- [23] I.M. Klotz, D.L. Hunston, Proteins affinities for small molecules: conceptions and misconceptions, *Arch. Biochem. Biophys.* 193 (1979) 314–328.
- [24] F.C. Mills, M.L. Johnson, G.K. Ackers, Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves, *Biochemistry* 15 (1976) 5350–5362.
- [25] G.K. Ackers, J.H. Hazzard, Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity, *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993) 385–390.
- [26] M.F. Perutz, A.J. Wilkinson, M. Paoli, G.G. Dodson, The stereochemical mechanism of the cooperative effects in haemoglobin revisited, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27 (1998) 1–34.

## REFERENCIAS

- ACKERS, G.K. & HAZZARD, J.H. (1993). Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* 18, 385-390.
- ADAIR, G.S. (1925). The hemoglobin system. VI: The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 63, 529-545.
- BENESCH, R., & BENESCH, R.E., (1969). Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature* 221:618-622.
- BOERI, E. (1962). Enzyme Reactions. In: *Physicomathematical Aspects of Biology*. Proceedings of the international School of Physics, pp. 95. New York: Academic Press.
- BOWMAN, J.D. & ALADJEM, F. (1963). A method for the determination of heterogeneity of antibodies. *J. Theor. Biol.* 4, 242-253.
- DI CERA, E. (1995). *Thermodynamic Theory of Site-specific Binding Processes in Biological Macromolecules*, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- FERRY, J.D. (1970). *Viscoelastic Properties of Polymers*, 2<sup>nd</sup> Edn, Chap.4, New York: Wiley.
- FERMI, E. (1936). *Thermodynamics*. Dover, New York.
- FLETCHER, J. E., SPECTOR, A.A., & ASHBROOK, J.D. (1970). Analysis of macromolecule ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochem.* 9, 4580-4587.
- GULDBERG, C.M. & WAAGE, P. (1867). *Etudes sur les Affinités Chimiques*. Brögger and Christie, Christiania.
- HERNANDEZ, M.M. & JOSE, M.V. (2003). Positive cooperativity induces multimodal site and thermodynamic affinity distributions in multivalent proteins. *Anal. Biochem.* 313: 226-233.
- HILL, A.V. (1910). The possible effects of aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curve. *J. Physiol.* 40: iv-vii.
- HUNSTON, D.L. (1975). Two techniques for evaluating small molecule-macromolecule binding in complex systems. *Anal. Biochem.* 63, 99-109.

- JOSÉ, M.V., & LARRALDE, C. (1982). Alternative interpretation of unusual Scatchard plots: contribution of interactions and heterogeneity. *Math. Biosci.* 58, 159-170.
- JOSÉ, M.V., & JOSÉ, J. (1998). Probability distributions of thermodynamic affinities for heterogeneous receptor populations. *J. Theor. Biol.* 190, 85-92.
- JOSÉ, M.V., & JOSÉ, J.V. (2001). *Thermodynamic distributions of heterogeneous receptor populations.* In *Drug-Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications.* (Raffa, R.B., ed) pp. 593-601. New York: John Wiley & Sons, Ltd.
- KOSHLAND, D. E., NÉMETHY, G., & FILMER, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5, 365-385.
- KLOTZ, I.M. (1946). The application of the law of mass action to binding proteins. Interactions with calcium. *Arch. Biochem.* 9, 109-117.
- KLOTZ, I.M. & HUNSTON, D.L. (1975). Protein interactions with small molecules. Relationships between stoichiometric binding constants, site binding constants and empirical parameters. *J. Biol. Chem.* 250, 3001-3009.
- KLOTZ, I.M. & HUNSTON, D.L. (1979). Proteins affinities for small molecules: conceptions and misconceptions. *Arch. Biochem. Biophys.* 193, 314-328.
- KLOTZ, I.M. (1997). *Ligand-Receptor Energetics: A Guide for the Perplexed,* New York: John Wiley & sons, Inc.
- KLOTZ, I.M. (2001). *Drug-Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications.* John Wiley & Sons, L.td.
- MILLS, F.C., JOHNSON, M.L. & ACKERS, G.K. (1976). Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves. *Biochemistry* 15, 5350-5362.
- MONOD, J., WYMAN, J., & CHANGEAUX, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.
- MONOD, J., CHANGEUX J.P., & JACOB, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306-29.

- NINOMIYA, K. & FERRY, J.D. (1959). Some approximate equations useful in the phenomenological treatment of linear viscoelastic data. *J. Colloid Sci.* 14, 36-48.
- OLSON, J.S., ANDERSON, M. E., & GIBSON, Q. H. (1971). The dissociation of the first oxygen molecule from some mammalian oxyhemoglobins. *J. Biol. Chem.* 246, 5919-5923.
- PAULING, L., PRESSMAN, D., & GROSSBERG, A.L. (1944). The serological properties of simple substances. VII. A quantitative theory of the inhibition by haptens of the precipitation of heterogeneous antisera with antigens, and comparison with experimental results for polihaptenic simple substances and azoproteins. *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 784-792.
- PERRELLA, M., RIPAMONTI, M., & CACCIA, S. (1998). Modulation of the association reaction between hemoglobin and carbon monoxide by proton and chloride. *Biochemistry* 37, 2017-2028.
- PERRELLA, M., & DI CERA, E., (1999). CO ligation intermediates and the mechanism of hemoglobin cooperativity. *J. Biol. Chem.* 274, 2605-2608.
- PERUTZ, M. F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228, 726-739.
- PERUTZ, M.F. (1972). Nature of heme-heme interaction. *Nature* 237:495-499.
- PERUTZ, M. F. (1989). Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q.Rev.Biophys.* 22, 139-236.
- PERUTZ, M. F., WILKINSON, A. J. & DODSON, G. G. (1998). The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 1-34.
- PRIGOGINE, I. & DEFAY, R. (1954). Chemical Thermodynamics. Longman, New York.
- RAFFA, R.B. (2001). Drug-receptor thermodynamics: introduction and applications. John Wiley & Sons, Ltd.
- SCATCHARD, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.

- SCHUMACHER, M.A., DIXON, M.M., KLUGER, R., JONES, R.T., BRENNAN, R.G. (1995). Allosteric transition intermediates modeled by crosslinked haemoglobins. *Nature*. 375, 84-87.
- SCHRÖDINGER, E. (1946). *Statistical Thermodynamics*. Dover, New York.
- SCIUTTO, E., GARAT, B., ORTEGA, E., & LARRALDE, C. (1987). Antibody heterogeneity: theoretical and experimental evaluation of a simple procedure to describe different affinities in hapten binding reactions. *Mol. Immunol.* 24, 577-585.
- SILVA, M.M., ROGERS, P.H., ARNONE, A. (1992). A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 267, 17248-56.
- SMITH, F.R., LATTMAN, E.E., CARTER, C.W. Jr. (1991). The mutation beta 99 Asp-Tyr stabilizes Y, a new, composite quaternary state of human hemoglobin. *Proteins*. 10, 81-91.
- SIPS, R. (1948). On the structure of a catalyst surface. *J. Chem. Phys.* 16, 490-495.
- THAKUR, A.K., MUNSON, P.J., HUNSTON, D.L., & RODBARD, D. (1980). Characterization of ligand-binding systems by continuous affinity distributions of arbitrary shape. *Anal. Biochem.* 103, 240-254.
- WYMAN, J.Jr. (1964). Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv. Prot. Chem.* 19, 223-86.